UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG UND TRENNUNG DER ZIRKULÄREN DNS-MOLEKÜLE IN NICHT INFIZIERTEN UND SV40-INFIZIERTEN BSC-1-ZELLEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Liana Tejmar
aus Prag

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548928_0010

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG UND TRENNUNG DER ZIRKULÄREN DNS-MOLEKÜLE IN NICHT INFIZIERTEN UND SV40-INFIZIERTEN BSC-1-ZELLEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Liana Tejmar
aus Prag

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 30. März 1979

Dekan: Professor Dr. F. Oberwinkler
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. W. Klietmann
2. Berichterstatter: Professor Dr. V. Braun

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. W.Klietmann am Friedrich-Miescher--Laboratorium der Max-Planck-Gesselschaft, Abteilung Prof. Dr. F. A. Anderer in Tübingen durchgeführt.

Ich danke Herrn Dr. Klietmann für die Überlassung des Themas und die kritische Korrektur des Manuskriptes.

Herrn Prof. Dr. F. A. Anderer danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes, sowie die Bereitstellung des Doktorandenstipendiums der Max-Planck-Gesselschaft.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. W. Büsen für sein Geschenk an Ribonuclease H und Herrn P. Kolar für die sorgfältige Ausführung der Zeichnungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. D. Royer für die freundliche Anleitung in der Spreitungstechnik und Herrn Prof. Dr. H. Frank und seinen Mitarbeitern für die Möglichkeit, die elektronenmikroskopische Untersuchungen in ihrem Labor vorzunehmen, sowie für die Ausführung der Fotoarbeiten.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite:
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	5
2.1.	Chemikalien	5
2.2.	Sonstiges Material	5
2.3.	Nährmedien	6
2.4.	Lösungen und Puffer	6
2.5.	Organismen	9
2.6.	Anzuchtbedingungen	9
2.7.	Infektion der BSC-1-Zellen mit SV40-Virus	11
2.8.	Indirekte Immunfluoreszenz	12
2.9.	Radioaktive Markierung	13
2.10.	Messung der Radioaktivität	14
2.11.	Zellfraktionierung	15
2.12.	Isolierung der DNS	16
2.13.	Isolierung und Reinigung des SV40-Virus	17
2.14.	Ermittlung der DNS-Menge	18
2.15.	Ermittlung der CsCl-Dichte	19
2.16.	CsCl-Gradienten	19
2.17.	CsCl-Äthidiumbromid-Gradienten	20
2.18.	Lineare 5-20%tige Saccharose-Gradienten	21
2.19.	Versuchsbedingungen für Ribonuclease--Wirkung	22
2.20.	Agarose-Gel-Elektrophorese	22
2.21.	Präparation der DNS für elektronenmikroskopische Untersuchung	24

		Seite:
3.	Ergebnisse	25
3.1.	Zur Infektion der Affennierenzellen in Gewebekultur mit SV40-Virus	25
3.1.1.	Kinetik des ^{3}H-Thymidin-Einbaus in DNS während der Infektion der BSC-1-Zellen mit SV40-Virus	26
3.1.2.	T-Antigen Nachweis während der Infektion	29
3.2.	Trennung der DNS-Moleküle in CsCl-Dichtegradienten	33
3.3.	Trennung der DNS-Moleküle im CsCl-EB-Gradienten	43
3.3.1.	Trennung und Charakterisierung der DNS aus Ganzzellysaten nicht infizierter Zellen	43
3.3.2.	Trennung und Charakterisierung der DNS aus Ganzzellysaten SV40-infizierter Zellen	48
3.3.3.	Analyse der DNS-Moleküle aus isolierten Mitochondrien infizierter und nicht infizierter Zellen	58
3.3.4.	Analyse der DNS-Moleküle aus cytoplasmatischen Überständen infizierter und nicht infizierter Zellen	66
3.4.	Überführung der zirkulären mt-DNS-Moleküle in die lineare Form durch die Ribonuclease-Wirkung	73
3.5.	Trennung der verschiedenen DNS-Moleküle mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese	78
4.	Diskussion	82

		Seite:
5.	Zusammenfassung	91
6.	Literaturverzeichnis	93

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

C	Cytosin
cyt-DNS	cytoplasmatische, minizirkuläre Desoxyribonucleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNase	Desoxyribonuclease
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EB	Äthidiumbromid
EDTA	Äthylendiaminotetraessigsäure-diNatrium-Salz
G	Guanin
Ipm	Impulse/Minute
MEM	Minimal Essential Medium
Mt-DNS	mitochondriale Desoxyribonucleinsäure
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFU	Plaque Forming Units
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNase	Ribonuclease
S	Sedimentationskonstante nach Svedberg
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen/Minute

1. E I N L E I T U N G

Die zunächst nur vermutete Existenz eines extranucleären genetischen Apparates hat sich während der letzten Jahre mehrfach bestätigt. Der Nachweis nichtchromosomaler DNS als genetische Trägersubstanz gelang sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten. In allen untersuchten Organismen wurde diese DNS in verschiedenen cytoplasmatischen Organellen, wie Plasmiden (Clowes, 1972), Kinetoplasten (Simpson, 1972), Chloroplasten (Ellis und Hartley, 1974) und Mitochondrien (Nass und Nass, 1963) lokalisiert.

Mitochondrien, für die eukaryontische Zelle unentbehrliche Orte der Respiration und Energieumwandlung, stellen ein vom Zellkern weitgehend unabhängiges, vollständiges, genetisches System dar. Neben der organellspezifischen DNS, 2-8 Moleküle pro Organelle (Bahr, 1971), besitzen Mitochondrien eine eigene DNS-Polymerase (Tanaka und Koike, 1978), Ribosomen, die kleiner sind als die des Cytoplasma (Dawid, 1972), von den cytoplasmatischen t-RNS-Molekülen physikalisch unterschiedliche t-RNS (Blossey und Künzel, 1972) und somit auch einen kompletten Apparat zur mitochondrienspezifischen Proteinsynthese.

Mitochondriale DNS aus allen bisher untersuchten Säugetierzellen unterscheidet sich von chromosomaler DNS in mehreren Parametern. Sie bildet geschlossene dopelsträngige Ringmoleküle, die alle um 5 µm lang sind, und als

histonfreier nackter Nucleinsäurefaden mit einem Fixationspunkt an der inneren Mitochondrienmembran (attachment site) in der Organelle vorliegt. Ihr GC-Gehalt kann niedriger, gleich oder grösser sein als der der korrespondierenden nucleären DNS. In Säugertierzellen ist dieser Unterschied sehr klein (Nass, 1969). Diese Fakten unterstützen die angenommene Unabhängigkeit im Bezug auf Funktion und evolutionären Ursprung mitochondrialer DNS vom genetischen Apparat des Kernes. Es konnte bisher auch nicht bewiesen werden, dass die Struktur der mitochondrialen DNS von der des Zellkernes beeinflusst wäre.

Andererseits aber zeigen Hybridisierungsversuche mitochondrialer DNS mit nucleärer DNS die Homologie einiger kürzer Nucleotidsequenzen in diesen beiden DNS-Molekülen (Borst, 1972). Ausserdem haben, neben anderen, Westergaard et al. (1970) und Faye et al. (1974) in ihren Arbeiten Hinweis für eine nucleäre Kontrolle des Grundmechanismus der mt-DNS-Replikation und Transkription durch chromosomale Kodierung der mt-DNS-Polymerase und anderer hierfür notwendiger Enzyme geliefert. Diese Erkenntnisse schliessen also eine völlige Selbständigkeit des mitochondrialen Systems aus.

Neben den organellgebundenen DNS-Molekülen wurden in vielen Eukaryonten kleine, doppelsträngige, geschlossene DNS-Ringmoleküle, entweder im Cytoplasma freiliegend (Bell, 1969), in Verbindung mit Mikrosomen (Bond et al., 1969) oder mit der Plasmamembran (Lerner et al., 1971)

stehend, entdeckt. Es ist bis heute ungeklärt, ob es sich bei dieser cytoplasmatischen **DNS** um Plasmide oder Episome handelt und welche biologische Funktion sie ausübt. Diese cytoplasmatische DNS hat viele Ähnlichkeiten mit der nucleären DNS (Williamson et al., 1972), die Herkunft konnte bis jetzt aber noch nicht geklärt werden. Sie wurden in Hefezellen im Zusammenhang mit einer Resistenz gegen verschiedene Antibiotika (Guerineau et al., 1974), in tierischen bzw. menschlichen Zellen jedoch ohne erkennbare Zusammenhänge mit bestimmten Funktionen (Rush et al., 1971, Radloff et al., 1967, Smith und Vinograd, 1972, Solage und Laskov, 1975, Modak et al., 1975) gefunden.

Die Rolle des gesamten extranucleären genetischen Systems tierischer Zellen im Ablauf einer viralen Infektion ist bisher noch nicht genügend untersucht worden. Die Voraussetzung dafür ist jedoch eine eingehende Untersuchung der DNS dieser Systeme. Es wurde deshalb in dieser Arbeit der Versuch unternommen, verschiedene Eingenschaften dieser extranucleären zirkulären DNS-Moleküle in nicht infizierten Zellen mit denen aus einem identischen Zellsystem, dass mit einem DNS-Virus infiziert worden ist, zu vergleichen. Die Wahl des Virus fiel auf das wohl am intensivsten untersuchte Simian Virus 40 (SV40).

SV40 gehört zu der Papovavirusgruppe und verursacht während der produktiven Infektion in Affennierenzellen einen cytopathischen Effekt. Das SV40-Virus besteht aus einer Proteinhülle und einem doppelsträngigen, geschlos-

senen DNS-Ringmolekül (Anderer et al., 1967) mit einem Molekulargewicht um $3x10^{-6}$ daltons. Der Mechanismus der Infektion, der später in Zusammenhang mit notwendigen Vorversuchen zu dieser Arbeit besprochen wird, wurde bereits eingehend untersucht. Diese Untersuchungen beziehen sich jedoch hauptsächlich auf die genetische Wechselwirkung viraler DNS mit der des Zellkernes, sowie auf die Veränderungen der DNS-Moleküle des Virus.

Neben der Charakterisierung der zirkulären nichtchromosomalen DNS-Moleküle in infizierten und nicht infizierten Zellen sollte in dieser Arbeit auch die Frage der optimalen Trennung dieser verschiedenen DNS-Moleküle voneinander bzw. von der SV40-DNS untersucht werden. Zur Klärung dieser Problemstellung wurden einige bereits bewährte Methoden, deren Mechanismus im jeweiligen Ergebnisteil erläutet wird, herangezogen und erfolgreich eingesetzt.

2. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

2. 1. Chemikalien

Soweit nicht gesondert aufgeführt, handelt es sich um analysenreine Substanzen der Firma Merck AG, Darmstadt.

Von Bayer AG, Leverkusen: Penicillin
Von Boehringer GmbH,Mannheim: Ribonuclease T_1
Von Calbiochem, San Diego, USA: Äthidiumbromid, Pronase
Von Heyl, Berlin: Streptomycin
Von New England Nuclear, Boston, USA: Thymidin (Methyl-^{3}H) spez. Radioaktivität: 40-60 Ci/mmol
Von Pharmacia, Uppsala, Schweden: Sephadex-200
Von Seromed, München: Fötales Kälberserum
Von Serva, Heidelberg: Agarose, Saccharose (frei von Ribonuclease), Trypsin (rein, 1:250 für Gewebekultur)
Von Sigma, München: Cytochrom C, Ribonuclease A

2. 2. Sonstiges Material

Filterpapierrondellen, Whatman Grade 3 MM, Ø 2,5 cm, von W. R., Balston Ltd., Maidstone, England
Petrischalen von Becton, Dickinson, Heidelberg
Visking-Dialysierschläuche von Serva, Heidelberg
SV40-Marker-DNA (Methyl-^{14}C)-Thymidin, spez. Radioaktivität: 10896 Ipm/ µg DNA von Herrn Dr. W. Klietmann

2. 3. Nährmedien

2. 3. 1. Für Anzucht von BSC-1-Zellen:
Eagle's Minimal Essential Medium, modifiziert nach Dulbecco (1959): 0,21 g L-Arginin, 0,095 g L-Valin, 0,096 g L-Threonin, 0,062 g L-Histidin, 0,104 g L-Isoleucin, 0,104 g L-Leucin, 0,145 g L-Lysinmonochlorid, 0,03 g L-Methionin, 0,064 g L-Phenylalanin, 0,02 g L-Tryptophan, 0,072 g L-Thyrosin, 0,048 g L-Lysin, 0,6 g L-Glutamin, 0,11 g Na-Pyruvat, 0,004 g Cholin, 0,004 g Thiamin, 0,008 g Inositol, 0,004 g Nicotinamid, 0,004 g Pantothensäure, 0,004 g Pyridoxal, 0,004 g Riboflavin, 0,004 g Folinsäure, 0,0001 g $Fe(NO_3)_3 \times 9\ H_2O$, 3,7 g $NaHCO_3$, 6,8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,2 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 0,1 g Glukose, 0,265 g $CaCl_2$, 0,02 g Phenolrot, 3,3 ml 1N HCl, 1 l bidestiliertes H_2O, 0,1 g Streptomycin, 10^5 E Penicillin, 10% fötales Kälberserum, mit CO_2 auf etwa pH 7,2 eingestellt.

2. 3. 2. Für infizierte Zellen:

Nach der Infektion der BSC-1-Zellen mit SV40-Virus wurde das unter 2. 3. 1. beschriebene Nährmedium jedoch mit nur 2% fötalem Kälberserum benutzt.

2. 4. Lösungen und Puffer

Trypsinlösung — Trypsin 1:250 10%, 0,8 g NaCl, 0,04 g KCl, 0,006 g Na_2HPO_4,

	0,006 g KH_2PO_4, 5 g Glukose, 100 ml H_2O, 0,05% EDTA, 4 l PBS^-, mit 1N NaOH auf pH 7,2
PBS^- - Puffer	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g $Na_2HPO_4 . 2\ H_2O$, 1 g KH_2PO_4, 1 l H_2O, pH 7,2
PBS^+ - Puffer	$PBS^- + Ca^{++}$, Mg^{++}
Einfriermedium	70% MEM 10% fötales Kälberserum, 20% fötales Kälberserum, 10% DMSO
Scintillationslösung	50 mg POPOP, 4 g PPO, 1 l Toluol
Tris - Puffer	10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8
H - Puffer	10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8
Saccharoselösungen für Schritt-Gradienten	a) 1 M Saccharose in H-Puffer b) 1,5 M Saccharose in H-Puffer c) 2,5 M Saccharose in H-Puffer
SDS-Lösung	2% SDS in Tris-Puffer

CsCl-Lösung	10 M CsCl in Tris-Puffer
EB-Lösung	12 mg Äthidiumbromid/ml Tris--Puffer
S-Puffer	1 M NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,6
Saccharoselösungen für linearen Gradienten	a) 5% Saccharose in S-Puffer b) 20% Saccharose in S-Puffer
E-Puffer	20 mM Na-Acetat, 40 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, mit Essigsäure auf pH 7,8
Agarose-Gellösung	0,7% Agarose, 0,5 µg EB/ml in E-Puffer
Cytochrom C - Lösung (2xkonzentriert)	120 ug/ml Cytochrom C, 0,6 M Ammoniumacetat, 1 mM EDTA
Uranylacetatlösung	50 mM HCl, 50 mM Uranylacetat 500fach in 90%igem Äthanol verdünnt

2. 5. Organismen

2. 5. 1. Zellen: a) BSC-1, Affennierenzellen aus dem Labor Prof. Dr. A. Anderer
b) F5-1, SV40-transformierte Hamsterzelle (Wolf et al., 1978)

2. 5. 2. Virus: SV40, Stamm 777 - 42 A aus dem Labor Prof. Dr. A. Anderer (Koch et al., 1967)

Ich möchte an dieser Stelle Frau B. Krafczyk für die freundliche Überlassung der BSC-1-Zellen und des Virus danken.

2. 6. Anzuchtbedingungen

2. 6. 1. BSC-1-Zellen

Die BSC-1-Zellen wurden in Roux-Schalen in dem oben angegebenen Nährmedium als Monolayer-Kultur bei 37° C gezüchtet. Für alle Versuche wurden Zellen der Generationen 100 - 140 gebraucht.

2. 6. 1. 1. Anzucht in Petrischalen

Die Zellen in Roux-Schalen wurden mit 0,25%iger Trypsinlösung in PBS^- abgelöst, in MEM aufgenommen und bei 300g abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Nährmedium suspendiert und in Petrischalen mit der Fläche von 50 cm^2 mit einer Dichte von 1-1,3 x 10^6 Zellen/Petrischale

eingesät. Das Nährmedium wurde auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschliessend wurden die Zellkulturen bei 37^{o} C und 5% CO_2-Luft-Gemisch inkubiert.

Für die DNS-Synthese-Versuche während der Infektion wurden die BSC-1-Zellen in Petrischalen mit der Fläche von 28 cm^2 gezogen. Die Einsaatdichte betrug hier $0,6 \times 10^6$ Zellen/Petrischale und das Gesamtvolumen des Nährmediums 5 ml.

2. 6. 1. 2. Deckglaskulturen

Deckgläser mit der Fläche von 432 mm^2 wurden in Aceton und Äthanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden sie im Autoklaven 30 min bei 120^{o} C sterilisiert. Vor Gebrauch wurden jeweils zwei in Petrischalen (28 cm^2) steril verteilt. Die Anzucht erfolgte gleich wie unter 2.6.1.1. beschrieben.

2. 6. 1. 3. Aufbewahrung der Zellen

Abtrypsinierte Zellen wurden bei 300g sedimentiert. Das Zellsediment wurde in Einfriermedium suspendiert, in Einfriergefässe überführt und für einige Stunden bei -20^{o} C gekühlt. Nach dieser Zeit erfolgte das Einfrieren bei -70^{o} C. Bei dieser Temperatur sind die Zellen jahrelang haltbar.

2. 6. 2. F5-1 - Zellen

Diese Zellen wurden unter gleichen Kulturbedingungen wie die BSC-1-Zellen gezüchtet.

2. 6. 3. SV40-Virus

Zellen wurden im stationären Wachstumsstadium mit 50 PFU/Zellen beimpft. Nachdem sie zu ca. 90-100% einen CPE aufwiesen, wurde die ganze Kultur zusammen mit dem Medium bei -20° C eingefroren. Durch weiteres dreimaliges Einfrieren und Auftauen wurden die Zellen vollständig zerstört, sodass auch intrazellulär gelagerte Viruspartikel in das Nährmedium traten. Durch eine Sedimentation der Zellreste (30 min bei 3000 Upm) in einer Stock-Zentrifuge erhält man eine Virussuspension, die als Ausgangsmaterial zu weiterer Beimpfung und Vermehrung des Virus benutzt werden kann.

2. 7. Infektion der BSC-1-Zellen mit SV40-Virus

Das Nährmedium wurde aus den zu infizierenden Zellkulturen abgesaugt. Anschliessend wurden die Zellkulturen mit 0,5 ml bei Petrischalen mit 28 cm^2 bzw. 1 ml bei Petrischalen mit 50 cm^2 einer Virussuspension in MEM + 2% fötales Kälberserum (Infektiosität:50 PFU/Zelle) überschichtet. Die Adsorbtion des Virus erfolgte während einstündiger Inkubation bei 37° C und 5% CO_2-Luft-Gemisch. Nach der Infektion wurden die Kulturen mit 5 bzw.

10 ml MEM + 2% fötales Kälberserum als Erhaltungsmedium gefüttert. Die Inkubation dieser infizierten Zellkulturen wurde bei 37° C und 5% CO_2-Luft-Gemisch fortgesetzt.

Mock-Infektion (simulierte Infektion) erfolgte wie oben beschrieben, jedoch mit virusfreiem Medium.

2. 8. Indirekte Immunfluoreszenz

2. 8. 1. T-Serum

Neugeborene syrische Goldhamster wurden mit $2x10^6$ F5-1--Zellen/Tier subcutan am Nacken inokuliert. Nach der Bildung von Tumoren in ca. 8 Wochen wurden sie mit der Herzpunktionstechnik entblutet. Das aus diesem Blut gewonnene Serum wurde für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung 1:10 mit PBS^+ verdünnt.

2. 8. 2. FITS-Serum

Kaninchen Anti-Hamster-Gamma-Globulin, konjugiert mit Fluoreszeinisothiocyanat (Sevac, Prag).

2. 8. 3. Indirekte Immunfluoreszenztechnik

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurde nach Klietmann und Seemayer (1971) durchgeführt.

Deckglaskulturen mit SV40-infizierten BSC-1-Zellen wurden aus der Petrischale entnommen, mit PBS^+ 3mal gut gewaschen, 10 min in Aceton fixiert und an der Luft getrocknet. Nach der Fixierung können sie trocken bis zu 1 Woche vor der weiteren Verarbeitung bei -20° C aufbewahrt werden. Anschliessend wurden die fixierten Deckglaskulturen mit PBS^+ angefeuchtet, mit T-Serum überschichtet und 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Nach dieser Zeit wurde das T-Serum von der Oberfläche abgetropft und alle ungebundenen Antikörpermoleküle durch dreimaliges Waschen mit PBS^+ entfernt. Daraufhin wurde das FITS-Serum auf die Oberfläche aufgetragen und 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer bei Dunkelheit inkubiert. Abschliessend erfolgt eine dreimalige Waschung in PBS^+.

Die so gefärbten Deckglaskulturen wurden in einem Glycerin-PBS^+-Gemisch (9:1) auf den Objektträgern eingedeckt. Die Färbung wurde anschliessend unter einem UV-Auflichtmikroskop (Zeiss) betrachtet und fotografiert.

Als positive Kontrolle für das SV40-spezifische T-Antigen wurden Deckglaskulturen von SV40-transformierten Hamstertumorzellen (F5-1) wie oben beschrieben behandelt.

2. 9. Radioaktive Markierung

2. 9. 1. Pulsmarkierung der DNS mit ^{3}H-Thymidin bei Einbaukinetikversuchen

Die Monolayer-Zellkulturen infizierter bzw. Mock-infizierter BSC-1-Zellen wurden zu den Zeiten 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 und 84 Stunden nach der Infektion für die Dauer von jeweils 12 Stunden mit 5 µCi ^{3}H-Thymidin/ml MEM markiert (Rush et al., 1971).

2. 9. 2. Markierung der DNS mit ^{3}H-Thymidin für die Analyse in Gradienten

Die Zellen wurden sofort nach dem Einsähen in die Petrischalen mit 2,5 µCi ^{3}H-Thymidin/ml MEM markiert.

2. 10. Messung der Radioaktivität

Die zu messenden DNS-Proben wurden auf Filterpapierrondellen pipetiert, getrocknet, in eiskalter 10%iger TCA mit 1% tetra-Natriumpyrophosphat 10 min gefällt, 2mal 10 min in eiskalter 5%iger TCA mit 1% tetra-Natriumpyrophosphat, 1mal 10 min in 90%igem Äthanol und 1mal 10 min in Äther nachgewaschen. Nach anschliessender Trocknung wurde die Radioaktivität in 5 ml Scintillationslösung im Tricarb Liquid Scintillationsspektrometer, Packard Modell 3375 5 min gezählt. Die Fenstereinstellung für die ^{3}H - Messung war A-B= 30-1000 bei der Verstärkung von 50%. Die ^{14}C - Messung erfolgte bei C-D= 168-1000 und 7% Verstärkung. In beiden Fällen bewegte sich der Blindwert um 10 Ipm.

2. 11. Zellfraktionierung

Hierbei wurde die Methode von Smith und Vinograd (1972) angewandt.

Nach Dekantieren des MEM wurden die Zellen mit einem Gummischaber von ihrer Unterlage in PBS^- abgeschabt, bei 300g sedimentiert und 3mal mit PBS^- nachgewaschen. Das resultierende Sediment wurde in 3 Volumen H-Puffer resuspendiert und bei Raumtemperatur 20 min stehen gelassen. Diese Zellsuspension wurde anschliessend im Dounce-Homogenisator mit engem Pistill mit 20 - 30 Schlägen homogenisiert, bis ca. 90% der Kerne frei waren. Dieser Vorgang kann im Lichtmikroskop überprüft werden. Das Homogenat wurde mit 1 Volumen 1M Saccharoselösung in H-Puffer auf die Endkonzentration von 0,25M Saccharose eingestellt. Diese Suspension wurde auf einen Saccharose-Stufen-Gradienten aufgetragen. Der Saccharose-Stufen-Gradient besteht aus folgenden drei Schichten: 2,5M Saccharoselösung, 1,5M Saccharoselösung und 1M Saccharoselösung. Anschliessende Zentrifugation erfolgte im 41 SW - Rotor (Beckman) bei 25000 Upm (4° C) für 1 Stunde.

Das gleiche Volumen, das überschichtet wurde (cytoplasmatischer Überstand), wurde vorsichtig entfernt und gegen 500faches Volumen Tris-Puffer über 24 Stunden dialysiert. Die Mitochondrien, die eine Bande zwischen 1,5 und 1M Saccharose bilden, wurden mit einer rechtwinklig gebogenen Pasteurpipette abgezogen und im 51 SW - Rotor (Beckman) bei 15000 Upm (4° C) während 30 min sedimentiert.

Das mitochondriale Sediment wurde anschliessend mit Tris--Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C eingefroren.

2. 12. Isolierung der DNS

2. 12. 1. Aus ganzen Zellen

Die Extraktion der DNS aus ganzen Zellen wurde nach der Methode von Hirt (1967) entsprechend der Modifikation von Radloff et al. (1967) durchgeführt.

Monolayer-Zellkulturen wurden von MEM befreit, mit Tris--Puffer nachgewaschen und mit 1 ml 1%iger SDS-Lösung/Petrischale 30 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Lysate wurden mit einem Gummischaber abgeschabt, in Zentrifugengefässe überführt, mit 10M CsCl-Lösung auf die Endkonzentration von 1M CsCl eingestellt und über Nacht bei 4° C gekühlt. Die darauffolgende Zentrifugation erfolgte 30 min bei 17000g (4° C). Im resultierendem Überstand befindet sich DNS.

2. 12. 2. Aus isolierten Mitochondrien

1 Volumen der Mitochondrien - Suspension in Tris-Puffer wurde mit 1 Volumen 2%iger SDS-Lösung versetzt und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschliessend wurde das Lysat mit 10M CsCl-Lösung auf die Endkonzentration von 1M CsCl eingestellt, gekühlt und zentrifugiert, wie

unter 2.12.1. beschrieben.

2. 12. 3. Aus Cytoplasma

1 Volumen des gegen Tris-Puffer dialysierten cytoplasmatischen Überstandes aus der Zellfraktionierung (2.11.) wurde mit 1 Volumen 2%iger SDS-Lösung versetzt und weiter behandelt wie unter 2.12.1. bereits beschrieben. Um das Endvolumen möglichst klein zu halten, wurden die cytoplasmatischen Überstände im Dialysierschlauch vor dem Lysieren in Sephadex-200 auf das erwünschte Volumen eingeengt.

2. 13. Isolierung und Reinigung des SV40-Virus

Die Isolierung und Reinigung der ganzen Viruspartikel aus infizierten Zellen wurde nach der Methode von Koch et al. (1967) modifiziert.

Die Infektion der Zellen bis zur Erhaltung der Virussuspension wurde bereits unter 2.6.3. beschrieben. Diese Virussuspension wurde anschliessend im 21 - Rotor (Beckman) bei 17000 Upm (4° C) 17 Stunden zentrifugiert. Das resultierende Sediment wurde mit PBS^- gründlich resuspendiert und im 21 - Rotor bei 15000 Upm (4° C), 30 min weiter gereinigt. Durch eine weitere 17-stündige Zentrifugation des Überstandes im 21 - Rotor bei 17000 Upm (4° C) wurden die Viruspartikel erneut sedimentiert. Dieses Sediment wurde dann gründlich in 7,2 ml PBS^-

resuspendiert und mit 3,4 ml gesättigter CsCl-Lösung gemischt. Die Endreinigung erfolgte in diesem CsCl-Gradienten durch Zentrifugation im 50 Ti - Rotor (Beckman) bei 44000 Upm (4° C) während 20 Stunden. Die intakten Viruspartikel bilden eine Bande bei 1,34 g CsCl/ml.

2. 13. 1. Isolierung der Virus-DNS

Zur Isolation der viralen DNS aus gereinigten Viruspartikeln wurde die Methode von Rush et al. (1971) angewendet.

Die SV40-Bande aus dem CsCl-Gradienten (2.13.) wurde 24 Stunden gegen 500faches Volumen Tris-Puffer dialysiert. 1 Volumen der dialysierten Virussuspension wurde mit 1 Volumen 2%iger SDS-Lösung versetzt, 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und mit 10M CsCl-Lösung auf 1M CsCl eingestellt. Nach der Abkühlung bei 4° C wurde das Lysat am nächsten Tag 30 min bei 17000g (4° C) zentrifugiert. Im Überstand befindet sich die virale DNS.

2. 14. Ermittlung der DNS-Menge

Die Extinktion einer DNS-Lösung wurde bei 260 nm im Spektralphotometer PM QII der Firma Zeiss ermittelt. Als Leerwert diente jeweils der Puffer in welchem sich die zu messende DNS befand. Nach Yoshike (1968) wurde 1 OD_{260} gleich 50 µg DNS/ml gesetzt.

2. 15. Ermittlung der CsCl-Dichte

Die CsCl-Dichte wurde mit Hilfe des Refraktionsindexes Bestimmt.
Zur Messung wurden 10 µl der Probe im auf 25° C temperierten Refraktometer 20364 der Firma Schmidt-Haensch gemessen.

2. 16. CsCl-Gradienten

Eine 10M CsCl-Lösung wurde so mit einer DNS-Lösung und Tris-Puffer gemischt, dass das erwünschte Gesamtvolumen und die CsCl-Ausgangsdichte von ca. 1,7 g/ml erreicht wurde. Das Endvolumen eines Gradienten ist jeweils angegeben. Alle Gradienten wurden 48 Stunden bei 40000 Upm und 20° C im 50 Ti - Rotor zentrifugiert.

2. 16. 1. Bestimmung des GC-Gehalts

Die Berechnung des GC-Gehalts aus der korrespondierenden Schwebedichte der DNS im CsCl-Gradienten erfolgte nach Schildkraut et al. (1962).

$$GC\ (\%) = \frac{\rho - 1{,}66}{0{,}00098} \qquad \rho = \text{gemessene CsCl-Dichte}$$

2. 17. CsCl-Äthidiumbromid-Gradienten

Die DNS-Lösung in Tris-Puffer, Tris-Puffer und 10M CsCl--Lösung wurde so gemischt, dass das erwünschte Endvolumen und die CsCl-Ausgangsdichte von 1,58 - 1,6 g/ml ereicht wurde. Alle Gradienten wurden mit einer 1,2 mg EB/ml-Lösung auf die EB-Endkonzentration von 300 µg/ml eingestellt. Genaue Angaben über das Volumen und CsCl-Dichte sind im Ergebnisteil jeweils angegeben. CsCl-EB-Gradienten wurden 48 Stunden bei 40000 Upm und 20° C im 50 Ti -- Rotor (Beckman) zentrifugiert.

2. 17. 1. Bestimmung der Superhelixdichte

Die Berechnung der Superhelixdichte zirkulärer DNS wurde nach der Berechnung von Eason und Vinograd (1971) durchgeführt. Die theoretischen Grundlagen hierzu lieferten mit ihren Arbeiten Bauer und Vinograd (1968, 1970) und Gray et al. (1971).

$$\Delta\sigma_o = \sigma_o - \sigma_o^+ = 0{,}10 \left(\frac{\bar{r} \times \Delta r}{\bar{r}^+ \times \Delta r^+} \right) - 1$$

σ_o = Superhelixdichte (Anzahl der superhelikalen Drehungen je zehn Basenpaare)

σ_o^+ = Superhelixdichte des SV40-DNS-Moleküls = -0,039

Δr = Abstand zwischen offenen und geschlossenen DNS--Molekülen im CsCl-EB-Gradienten

$\bar{r}$ = Der mittlere Abstand von der Rotationachse

Die Werte, die mit + gekennzeichnet sind, gelten für SV40--DNS aus gereinigtem Virus, die hier als Vergleichssubstanz diente.

2. 18. Lineare 5-20%ige Saccharosegradienten

Die Zentrifugation der DNS-Moleküle in linearen Saccharosegradienten wurde nach den Angaben von Wong-Staal et al. (1973) durchgeführt.

In 41 SW Zentrifugenbecher (Beckman) wurde ein linearer 5-20%iger Saccharosegradient mit dem Volumen von 5 ml mit Hilfe der peristaltischen Pumpe, Varioperpex, LKB eingefüllt, der die Ionenkonzentration 1M NaCl, 5mM Tris-HCl, pH 7,6 enthielt. Jeder Gradient wurde mit 0,5 ml DNS-Lösung in S-Puffer überschichtet. Die Zentrifugation dauerte 105 min bei 36000 Upm und 20° C in einem 41 SW - - Rotor (Beckman). Die Gradienten wurden anschliessend vom Boden in gleich grossen Fraktionen abgelassen.

2. 18. 1. Berechnung des Sedimentationskoeffizienten

Die Berechnung des S-Wertes der DNS-Moleküle anhand ihrer Sedimentationsverhalten während der Saccharosedichtezentrifugation erfolgte nach Mahler und Cordes (1969).

$$S_{20,W}\ (\text{unbekannt}) = S_{20,W}\ (\text{bekannt}) \times R$$

$$R = \frac{\text{Abstand der unbekannten DNS von Meniskus}}{\text{Abstand der bekannten DNS von Meniskus}}$$

Als bekannte DNS wurde SV40-DNS mit 20S bei jeder Zentrifugation als externer Standart im gleichen Rotor mitzentrifugiert.

2. 19. Versuchsbedingungen für Ribonuclease-Wirkung

Die Versuchsbedingungen, sowie das Substrat-Enzym-Verhältnis, wurden den Angaben von Wong-Staal et al. (1973) angeglichen.

Die Stammlösungen von RNase A (2 mg/50 µl Tris-Puffer) und RNase T_1 (900 U/30 µl Tris-Puffer) wurden stets frisch angesetzt und um mögliche, störende DNase Aktivität auszuschalten 30 min bei 80° C vorinkubiert. Die Reaktionslösungen enthielten für 1 µg DNS in Tris-Puffer 0,4 mg RNase A bzw. 300 U RNase T_1 und wurden anschliessend 30 min bei 37° C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden zu jeder Probe 30 µg Pronase in Tris-Puffer zur Vermeidung der Ausfällung der DNS (Studier, 1965) zugegeben und weitere 10 min bei 37° C inkubiert. Die Kontrolle, ohne Zugabe von RNase, wurde gleich behandelt.

Anschliessend wurde jede Probe mit einem CsCl-EB-Gradienten gemischt und zentrifugiert, wie unter 2.17. bereits beschrieben.

2. 20. Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Auftrennung der DNS-Moleküle mit Hilfe der Agarose--Gel-Elektrophorese wurde nach Aaij und Borst (1972) durchgeführt.

Vorbereitung der Gele:

0,7% Agarose wurden in E-Puffer mit 0,5 µg EB/ml durch Erwärmen gelöst und anschliessend 20 min gekocht. Nach dem Einfüllen in 10 cm Plastikröhrchen mit 0,5 cm Innendurchmesser, wurden die Gele über Nacht bei 4° C auspolymerisiert. Die mit Gel gefüllten Röhrchen wurden, um ein Herausgleiten der Gele zu vermeiden, am unteren Ende mit Nylonnetzchen verschlossen und in einer Elektrophoresekammer befestigt. Die Puffergefässe wurde mit E-Puffer mit 0,5 µg EB/ml gefüllt.

Vorbereitung der Proben:

Die DNS-haltigen Proben wurden ausgiebig gegen E-Puffer dialysiert und mit 0,5 µg EB/ml versetzt. Die DNS-Konzentration betrug ca. 1 µg in nicht mehr als 100 µl E-Puffer. Die vorbereiteten Proben wurden vorsichtig auf die Geloberfläche geschichtet. Als Standart diente bei jedem Lauf SV40-DNS aus gereinigten Viruspartikeln.

Laufbedingungen:

Die Kathode des Stromgebers wurde am oberen Puffergefäss, die Anode am unteren angeschlossen. DNS ist negativ geladen und wandert zur Anode. Die Laufbedingungen waren 2 mA/Gel während 4 Stunden bei DNS-Proben aus isolierten Mitochondrien und 2 Stunden bei DNS-Proben aus cytoplasmatischen Überständen. Nach dem Lauf wurden die Gele aus den Plastikröhrchen entfernt und mit der Polaroid Land

Kamera auf den Polaroid Typ 55P/N-Film unter direkter UV-Licht-Beleuchtung fotografiert.

Extraktion der DNS aus Agarose-Gelen:

Die Extraktion der DNS aus Agarose-Gelen wurde nach der Methode von Thuring et al. (1975) durchgeführt.

Die DNS-Banden im Gel (sichtbar unter UV-Licht Bestrahlung) wurden ausgeschnitten und zwischen Parafilm bei -20° C für mehrere Stunden gefroren. Die gefrorene Gelstücke wurden anschliessend zwischen dem Parafilm gequetscht, bis etwa 70% als klare Flüssigkeit erschien. Diese Flüssigkeit wurde durch Zentrifugation in einer Eppendorfer Zentrifuge bei 8000g während 5 min von restlichen Agarose Fragmenten befreit.

2. 21. Präparation der DNS für elektronenmikroskopische Untersuchung

1 Volumen DNS-Lösung in Tris-Puffer wurde mit 1 Volumen einer Cytochrom C - Lösung gemischt. Die Endkonzentration der DNS betrug 0,5 µg/ml. 20 µl Tropfen dieses Gemisches wurden auf Parafilm aufgetragen und 5 min zugedeckt stehen gelassen. Anschliessend wurde dieser Tropfen mit Parlodion-Film überzogenen Kupfernetzchen angetippt. Die auf Netzchen gespreitete DNS wurde dann in der Uranylacetat-Lösung 20 sek. gefärbt. Nach der Trocknung wurden die Netze mit der 1003-Legierung bedampft.

3. E R G E B N I S S E

3. 1. Zur Infektion der Affennierenzellen in Gewebekultur mit SV40-Virus

Zur Aufklärung des Mechanismus der Infektion von Affennierenzellen mit SV40-Virus haben Barbanti-Brodano et al. (1970) und Hummeler et al. (1970) mit ihren Untersuchungen beigetragen. Sie stellten fest, dass die Adsorption des Virus an die Receptoren der Zellmembran innerhalb 2 Stunden nach der Infektion zu 50% erfolgt. Nach der Penetration wurden körnige Komplexe im Cytoplasma gefunden. Diese Tatsache deutet daraufhin, dass die Viruspartikel nicht frei, sondern in Verbindung mit cytoplasmatischen Strukturen in der Zelle vorliegen. Die Penetration des Zellkernes konnte schon zwischen 0,5 und 2,5 Stunden nach der Infektion beobachtet werden. Erst im Zellkern verlieren die Viruspartikel ihre Proteinhülle. Die darauf folgende SV40-Genexpresion vollzieht sich in zwei Phasen. Der frühen Phase wird die Induktion des T-Antigens und der zellulären DNS-Synthese, der späten Phase die Replikation der viralen DNS, die Synthese der Strukturproteine des Virions, ihre Zusammensetzung und die Reifung der neu gebildeten Partikel zugeordnet. Diese Hypothese stützt sich u.a. auf die Versuche von Rapp et al. (1965), bei denen die Existenz des Virus--Capsid-Antigens erst nach der Virus-DNS-Replikation nachgewiesen werden kann. Wird diese DNS-Synthese gehemmt, ist die Reifung der Viruspartikel beeinträchtigt, das Auftreten von T-Antigen aber bleibt bestehen.

Die Stimulation der zelleigenen DNS-Synthese in stationären Affennierenzellkulturen während der SV40-Infektion hat sich mehrfach bestätigt (Werchau et al., 1966, Hatanaka und Dulbecco, 1966, Ritzi und Levine, 1970). Levine (1971) konnte sogar eine Induktion der mitochondrialen DNS durch SV40-Infektion feststellen. Nur die BSC-1 Zellkulturen zeigten hier eine Ausnahme. Durch die Infektion dieser Zellen wurde die zelleigene DNS kaum stimuliert (1,1fach, bei AGMK-Zellen 1,8fach).

In diesem Kapitel soll der Ablauf der Infektion, und damit verbunden auch die DNS-Synthese der Zellen und auch des Virus in unserem System gezeigt werden.

Da das virusspezifische T-Antigen das erste nachweisbare intrazelluläre Produkt einer SV40-Infektion ist, wurde sein Auftreten mit Hilfe der Immunfluoreszenz beobachtet.

3. 1. 1. Kinetik des ^{3}H-Thymidin-Einbaus in DNS während der Infektion der BSC-1-Zellen mit SV40-Virus

Zu diesem Versuch wurden 8 frische stationäre Zellkulturen in Petrischalen (jeweils 2 x 10^{6} Zellen) mit 50 PFU/Zelle infiziert. Bei den 8 Kontrollzellkulturen wurde die Infektion simuliert. Jeweils eine infizierte und nicht infizierte Zellkultur wurde mit ^{3}H-Thymidin bei 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 und 84 Stunden nach der Infektion für eine Zeit von 12 Stunden markiert. Sofort nach der Markierungszeit wurde jede Zellkultur direkt in der

Petrischale lysiert. Das Ganzzellysat wurde wie im Methodenteil beschrieben weiter behandelt und die resultierende DNS im linearen Saccharosegradienten (5-20%) analysiert.

Die gefundene Radioaktivität der ganzen Gradienten wurde gezählt und jeweils addiert. Daraus ergaben sich die Werte der gesamten Einbaurate in einer Zeitperiode.

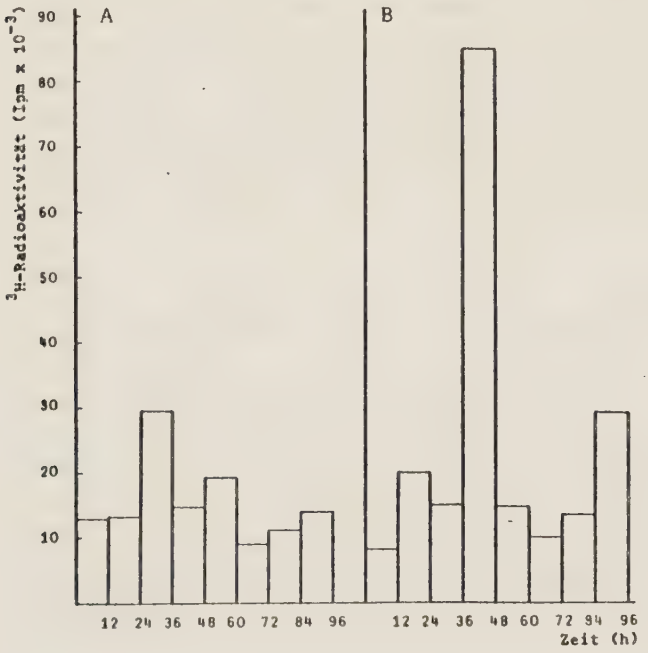


Abbildung 1: Einbaurate des ^{3}H-Thymidin in die gesamte DNS infizierter und nicht infizierter Zellen, A: Kontrollzellen, B: infizierte Zellen

Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, ist der gesamte Einbau des ^{3}H-Thymidin in die DNS in infizierten Zellen in der Zeit von 0-96 Stunden nach der Infektion höher als in den nicht infizierten Zellen.

Es blieb noch festzustellen welcher Anteil der Radioaktivität in die virale DNS eingebaut wurde. Dafür wurde die Radioaktivität der Fraktionen bei 16-21 S (SV40-DNS) aus den Saccharosegradienten prozentual ausgewertet, wobei die gesamte Radioaktivität des jeweiligen Gradienten 100% darstellte.

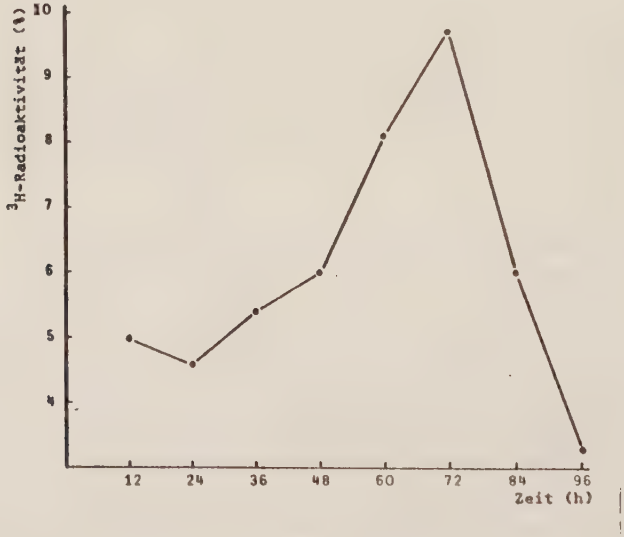


Abbildung 2: Einbaurate des ^{3}H-Thymidin in SV40-DNS als prozentualer Anteil der jeweiligen gemessenen Radioaktivität (s.Abb.1) in Abhängigkeit von der Zeit

Die Abbildung 2 zeigt einen Verlauf der SV40-DNS-Synthese während der Infektion. Der maximale Anstieg erfolgt zwischen 48 und 72 Stunden nach der Infektion. Dieses Ergebnis entspricht dem von Ritzi und Levine (1970). Der maximale Einbau der gesamten DNS fand jedoch schon zwischen 36-48 Stunden nach der Infektion statt (Abbildung 1). Es ist sogar zu beobachten, dass beim Anstieg der SV40--DNS-Synthese die gesamte Einbaurate abfällt. Die einzige Ausnahme stellt die Einbaurate während der Zeitperiode zwischen 36-48 Stunden nach der Infektion dar. Wird der Anteil der synthetisierten SV40-DNS von der gesamten DNS abgezogen und mit der DNS-Synthese stationärer nicht infizierter Zellen zwischen 0-96 Stunden nach der Infektion verglichen, stellt man fest, dass die zelluläre DNS-Synthese in diesem Zeitraum um ca. 50% angestiegen ist.

3. 1. 2. T-Antigen Nachweis während der Infektion

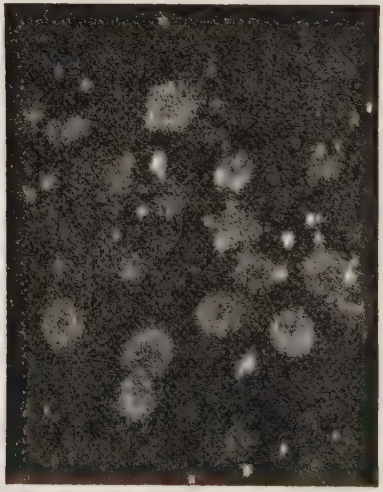
Wie schon unter 3.1. erwähnt, ist das T-Antigen das erste nachweisbare Produkt einer Virusinfektion in der Wirtszelle. Nach Tegtmeyer (1972) fungiert das T-Antigen sowohl als Anreger der viralen, als auch der wirtseigenen DNS-Synthese (Chou und Martin, 1975, Smith et al., 1971). Schon Hatanaka und Dulbecco (1966) konnten beobachten, dass das Auftreten des T-Antigens der Induktion der zellulären DNS-Synthese vorausgeht. Es wurde daher angenommen, dass sich das T-Antigen mit dem Chromatin der infizierten Zellen verbindet. Erst die Arbeit von

A

B

C

D



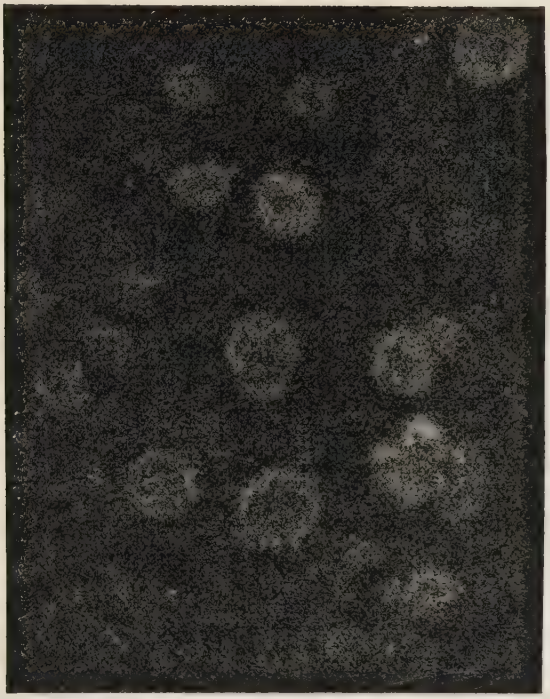


Abbildung 3: Nachweis des T-Antigens mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik
A: 18 Stunden, B: 30 Stunden, C: 42 Stunden, D: 54 Stunden, E: 66 Stunden nach der Infektion mit SV40

D'Alisa und Gershey (1978) brachte dafür den ersten Beweis. T-Antigen bindet sich an die Chromosomen und somit ist die Möglichkeit gegeben, dass diese Bindung an den Initiationsstellen der DNS-Replikation der Zelle statt findet.

Das intranucleäre T-Antigen kann mittels Immunfluoreszenz schnell und einfach nachgewiesen werden. Zur Durchführung dieses Testes wurden BSC-1-Zellen als Deckglaskulturen gezüchtet. Beim Erreichen der maximalen Dichte, also im stationärem Wachstum wurden sie mit 50 PFU/Zelle infiziert. Alle 6 Stunden nach der Infektion wurden 2 Deckglaskulturen entnommen, fixiert und trocken bei -20° C bis zur Färbung aufbewahrt. Die Färbemethode ist im Methodenteil unter 2.8. beschrieben.

In der Abbildung 3 sind Aufnahmen der Immunfluoreszenz des T-Antigens bei 18, 30, 42, 54 und 66 Stunden infizierten Zellkulturen festgehalten.

Bei den Zellkulturen, die kürzer als 30 Stunden infiziert waren, war keine Immunfluoreszenz zu erkennen. Die ersten positiv gefärbten Zellkerne treten erst bei 30 Stunden nach der Infektion auf. Bei den länger als 66 Stunden infizierten Zellen wurden die Zellkerne nicht häufiger oder intensiver gefärbt.

Die Ergebnisse, das Auftreten des T-Antigens 30 Stunden und der Anstieg der zellulären bzw. viralen DNS-Synthese 36 Stunden nach der Infektion, sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeiten.

3. 2. Trennung der DNS-Moleküle in CsCl-Dichtegradienten

Es ist bekannt, dass die Schwebedichte der DNS direkt proportional zu ihrem GC-Gehalt ist. Die Basenzusammensetzung der DNS ist nicht nur für einen Organismus bzw. eine Gewebe- oder Zellart eines Organismus charakteristisch, sondern auch für DNS-Arten einer Zelle. So fand Nass (1969), dass der GC-Gehalt der mitochondrialen DNS der Mäusefibroblasten Zellen niedriger ist, als der der nucleären DNS. Ein anderes Ergebnis erhielten Smith und Vinograd (1972) bei der Untersuchung der DNS-Moleküle in HeLa-Zellen. Hier erwies sich der GC-Gehalt der mitochondrialen DNS höher, als der der minizirkulären, cytoplasmatischen DNS. Dieser liegt wiederum sehr nahe den Werten für nucleäre DNS anderer menschlicher Zellen (Clayton und Vinograd, 1967).

Es soll an dieser Stelle über Untersuchungen der Basenzusammensetzung der einzelnen DNS-Arten in unserem Zellsystem berichtet werden. Die Frage, ob die Infektion dieser Zellen mit SV40-Virus irgendeine Verschiebung der Basenzusammensetzung verursacht, sollte hier ebenso geklärt werden.

Der GC-Gehalt lässt sich, wie bereits erwähnt, aus der Schwebedichte der DNS im Dichtegradienten bestimmen. Dazu wurden tritiierte DNS-Proben im CsCl-Gradienten der mittleren Dichte von ca. 1,7 g CsCl/ml zentrifugiert.

Zunächst wurde eine Probe des Ganzzellysates nicht infizierter Zellen analysiert. In Abbildung 4 ist ein Beispiel einer solchen Verteilung der DNS nach ihrer Schwebedichte in einem CsCl-Gradienten dargestellt.

Hierzu wurden $7{,}2 \times 10^7$ Zellen lysiert und der DNS-haltige Überstand nach der Proteinausfällung für eine isopyknische Gradientenzentrifugation mit 1,7 g CsCl/ml und einem Gesamtvolumen von 10 ml eingestellt. Die Zentrifugation erfolgte bei 40000 Upm in 50 Ti - Rotor (Beckman) für 48 Stunden bei 20° C. Der Gradient wurde dann von unten in 50 µl-Fraktionen abgelassen. Die Radioaktivität wurde bei den Fraktionen 70-130 gemessen. Da der erste Anstieg der Radioaktivität erst bei der Fraktion 95 statt findet, sind in der Abbildung 4 nur die Fraktionen 90÷120 dargestellt. Die Dichte wurde mit dem Refraktometer bei jeder zehnten Fraktion bestimmt.

Die deutlich erkennbaren Maxima bei 1,7, 1,695 und 1,685 g CsCl/ml wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Fraktionen bei 1,7 g CsCl/ml zirkuläre DNS mitochondrialer Grösse, bei 1,695 g CsCl/ml minizirkuläre und bei 1,685 g CsCl/ml lineare, also nucleäre DNS enthalten.

Da die Trennung dieser verschiedenen niedermolekularen DNS-Arten wegen des grossen Anteils nucleärer DNS nicht optimal ist, wurden noch Gradienten mit Lysaten der in Saccharose-Stufen-Gradienten isolierten Mitochondrien und cytoplasmatischer Überstände gefahren.

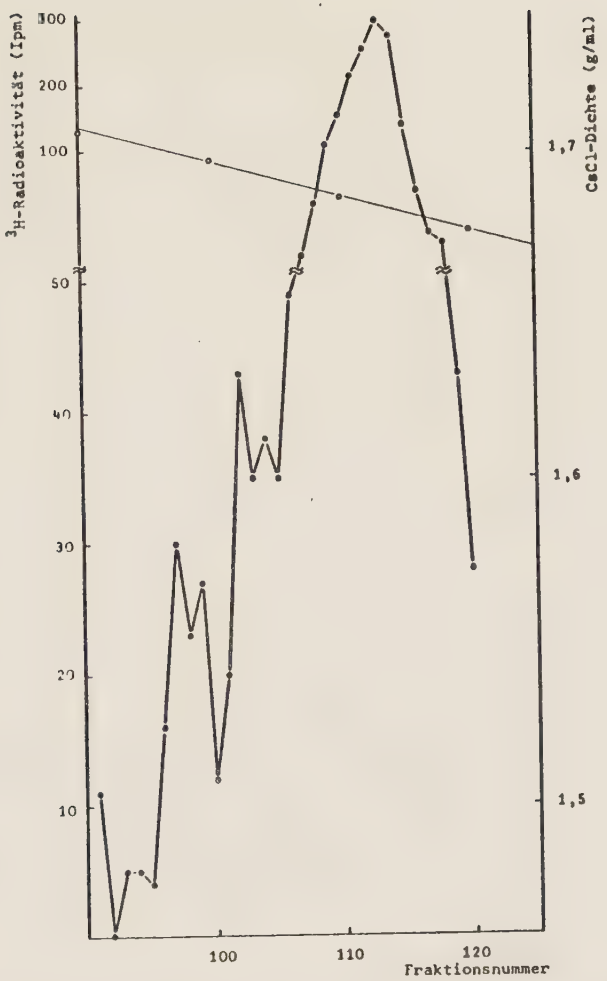


Abbildung 4: Trennung der ^{3}H-Thymidin markierten DNS-Moleküle des Ganzzellysates nach ihrer Schwebedichte im CsCl-Gradienten

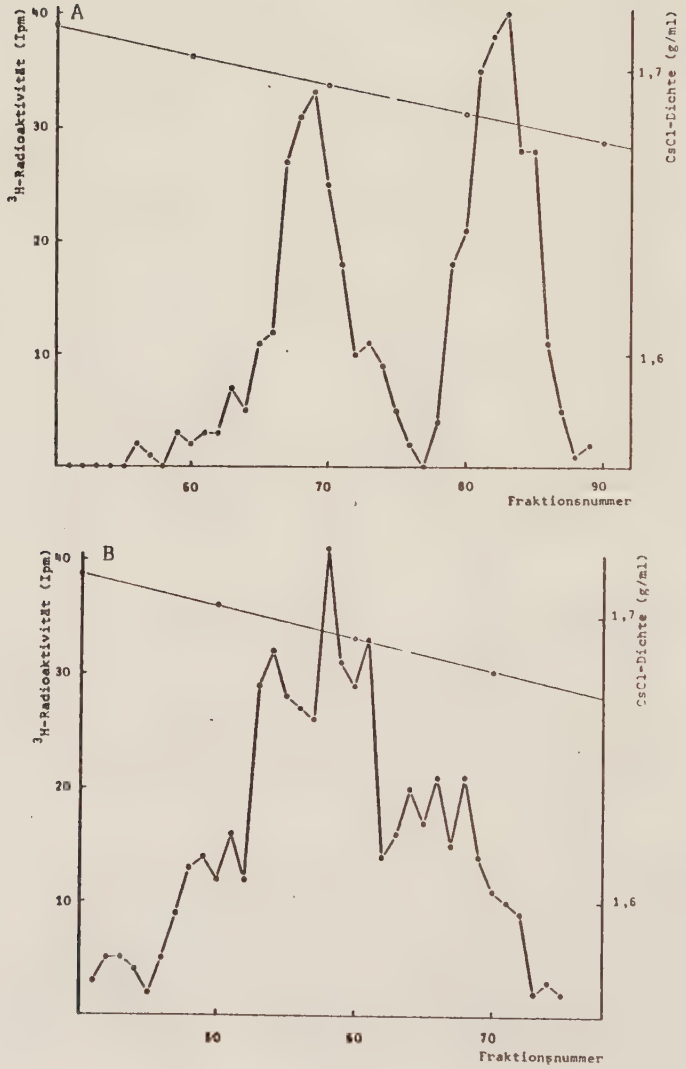

A
^{3}H-Radioaktivität (Ipm)
CsCl-Dichte (g/ml)
1,7
1,6
40
30
20
10
60
70
80
90
Fraktionsnummer
B
^{3}H-Radioaktivität (Ipm)
CsCl-Dichte (g/ml)
1,7
1,6
40
30
20
10
60
70
Fraktionsnummer

Abbildung 5: Trennung der DNS-Moleküle nicht infizierter Zellen in CsCl-Dichtegradienten
A: aus isolierten Mitochondrien
B: aus cytoplasmatischem Überstand

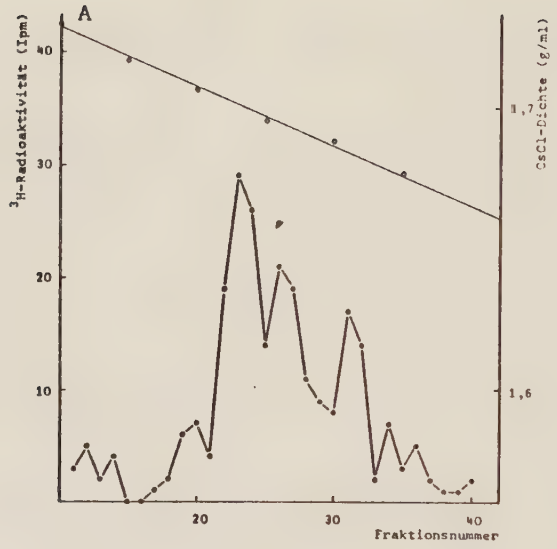
Die Abbildung 5 zeigt solche Auftrennung der DNS aus verschiedenen Fraktionen der Zelle.
Die Abbildung 5 A stellt einen 6 ml Gradienten der mittleren Dichte von 1,706 g CsCl/ml mit 10 µg DNS aus lysierten Mitochondrien (spezifische Radioaktivität: 72 Ipm/1 µg DNS) dar. Es wurden 80% der Radioaktivität wiedergefunden. In Abbildung 5 B ist ein 6 ml Gradient der mittleren Dichte von 1,704 g CsCl/ml mit DNS-haltigem lysiertem Überstand der Zellfraktionierung dargestellt. Die genaue Menge der DNS, und somit die spezifische Radioaktivität sind nicht feststellbar, da es sich in dieser Fraktion um ein DNS-RNS-Gemisch handelt ($OD_{260} : OD_{280} > 2$). Um Ausbeute bzw. Verlust kontrolieren zu können, wurden in diesen Fällen die absoluten Ipm gemessen. In diesem in Abbildung 5 B dargestelltem Gradienten waren im Ausgangsmaterial 1360 Ipm vorhanden, von denen 68% nach der Trennung wiedergefunden wurden. Beide Gradienten wurden in 50 Ti - Rotor (Beckman) bei 40000 Upm 48 Stunden bei 20° C zentrifugiert und anschliessend von unten in 50 µl-Fraktionen abgelassen. Die Dichte wurde im Refraktometer bei jeder zehnten Fraktion bestimmt. In Abbildung 5 werden nur die hier interessierenden Fraktionen gezeigt.

Die Trennung der niedermolekularen DNS aus subzellulären Fraktionen gelingt etwas besser, als im Gradienten mit Ganzzellysat (Abbildung 4) und die Schwebedichtewerte der einzelnen DNS-Moleküle entsprechen den Werten aus der Abbildung 4. Ein Problem stellt jedoch die unvermeidbare Kontamination der mitochondrialen DNS mit der nucleären, sowie der minizirkulären DNS und der cytoplasmatischen,

und umgekehrt der minizirkulären DNS mit mitochondrialer und nucleärer DNS dar.

Im Vergleich zur Schwebedichte der DNS-Moleküle aus infizierten Zellen ist kaum ein Unterschied feststellbar. Die Abbildung 6 zeigt die Trennung der tritiierten DNS--Moleküle solcher Zellen. Der in Abbildung 6 A dargestellte Gradient hat ein Volumen von 5 ml und die mittlere Dichte von 1,701 g CsCl/ml. Er beinhaltet 50 µg DNS aus isolierten Mitochondrien (spezifische Radioaktivität: 8 Ipm/1 µg DNS). Es wurden 71% der Radioaktivität wiedergefunden.
Die Abbildung 6 B stellt einen 6 ml Gradienten der mittleren Dichte von 1,701 g CsCl/ml mit DNS aus dem cytoplasmatischen Überstand der Zellfraktionierung dar. Die eingegebene Radioaktivität betrug 3500 Ipm; davon wurden 65% wiedergefunden. Beide Gradienten wurden in 50 Ti --Rotor (Beckman) bei 40000 Upm und 20° C 48 Stunden zentrifugiert und anschliessend von unten in 100 µl--Fraktionen abgelassen. Die CsCl-Dichte wurde bei jeder zehnten Fraktion im Refraktometer bestimmt.

Neben dem oben erwähnten Problem der Kontamination mit anderen zellulären DNS-Molekülen tritt hierbei die Schwierigkeit der Kontamination mit viraler DNS und damit der Trennung der mitochondrialen DNS mit ihrer Schwebedichte bei ca. 1,7 g CsCl/ml von der viralen DNS, die bei der Dichte von ca. 1,698 g CsCl/ml bandiert, auf.


A
^{3}H-Radioaktivität (Ipm)
40
30
20
10
1,7
1,6
CsCl-Dichte (g/ml)
20
30
40
Fraktionsnummer

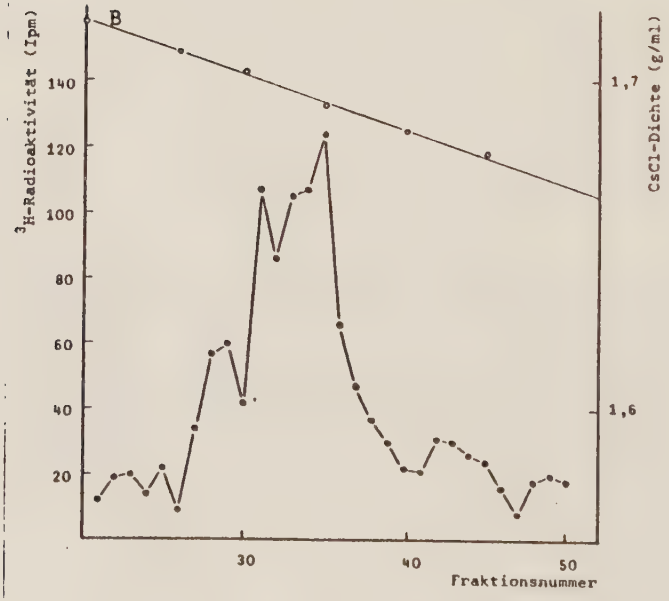

B
^{3}H-Radioaktivität (Ipm)
140
120
100
80
60
40
20
1,7
1,6
CsCl-Dichte (g/ml)
30
40
50
Fraktionsnummer

Abbildung 6: Trennung der DNS-Moleküle SV40-infizierter Zellen im CsCl-Dichtegradienten
A: aus isolierten Mitochondrien
B: aus cytoplasmatischem Überstand

Die hier aufgeführten Ergebnisse sollten nur als Beispiel betrachtet werden, denn bei jeder Zentrifugation verändern sich manche Parameter, die zu kleinen Abweichungen der Schwebedichtewerte führen. Deshalb wurden jeweils 10 Zentrifugationen durchgeführt, um möglichst genaue Werte der Schwebedichte und somit des GC-Gehaltes ermitteln zu können. In Tabelle 1 sind diese Werte zusammengefasst.

	mt-DNS bei g CsCl/ml	GC%	cyt-DNS bei g CsCl/ml	GC%
nicht infizierte Zellen	1,7008 ± 0,002	41,6	1,6941 ± 0,001	34,7
mit SV40-Virus infizierte Zellen	1,7004 ± 0,003	41,2	1,6959 ± 0,003	36,6

Tabelle 1: Zusammenfassung der Auswertungen aus den DNS-Zentrifugationen in CsCl-Dichtegradienten

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, besteht kein Unterschied in den Basenzusammensetzungen der mitochondrialen DNS aus infizierten und nicht infizierten Zellen. Bei der cytoplasmatischen DNS infizierter Zellen ist jedoch der GC-Gehalt etwas höher als bei der gleichen DNS nicht infizierter Zellen.

3. 3. Trennung der DNS-Moleküle im CsCl-EB-Gradienten

Mit Hilfe des zwischen die Basen der DNS interkalierenden Farbstoffes Äthidiumbromid und seiner Analoge ist die Möglichkeit der Trennung der geschlossenen zirkulären DNS-Molekülen von denen mit Einzelstrangbruch und linearen Molekülen im CsCl-Gradienten gegeben. Bei vielen DNS-Ringen ist die tertiäre Verdrillung der Doppelhelix bekannt. Hierbei spricht man von einer Superhelix, die tertiäre Windungen, sogenannte Twists besitzt. Unter Sättigungsbedingungen (300 µg EB/ml) wird weniger Farbstoff von superhelikalen Molekülen gebunden, als von den offen zirkulären und linearen Molekülen. Da der Farbstoff eine wesentlich geringere Dichte als die DNS hat, sind geschlossene Ringmoleküle schwerer. Die unterschiedliche Bindung des Farbstoffes resultiert dann in unterschiedlicher Schwebedichte dieser Moleküle in einem isopyknischen CsCl-Gradienten in Anwesenheit von Äthidiumbromid. Es wurde von Bauer und Vinograd (1970) gezeigt, dass diese Differenz in der Schwebedichte linear mit der ursprünglicher Superhelixdichte korreliert ist.

3. 3. 1. Trennung und Charakterisierung der DNS aus Ganzzellysaten nicht infizierter Zellen

Für den in Abbildung 7 dargestellten CsCl-EB-Gradienten wurden 4×10^7 nicht infizierte mit ^{3}H-Thymidin markierten Zellen in der stationären Phase direkt in Petrischalen mit 1%iger SDS-Lösung lysiert. Der aus den Lysaten durch

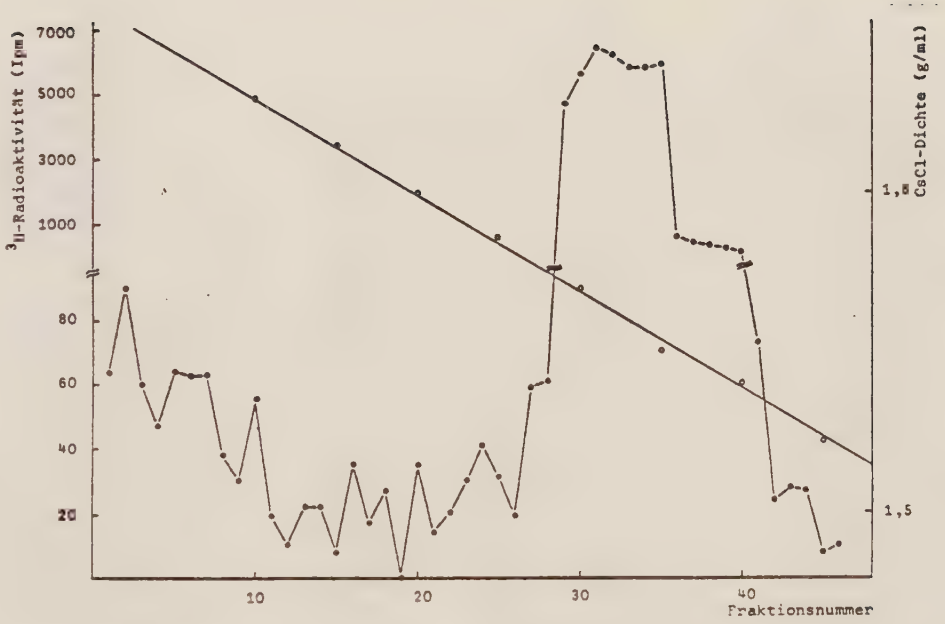
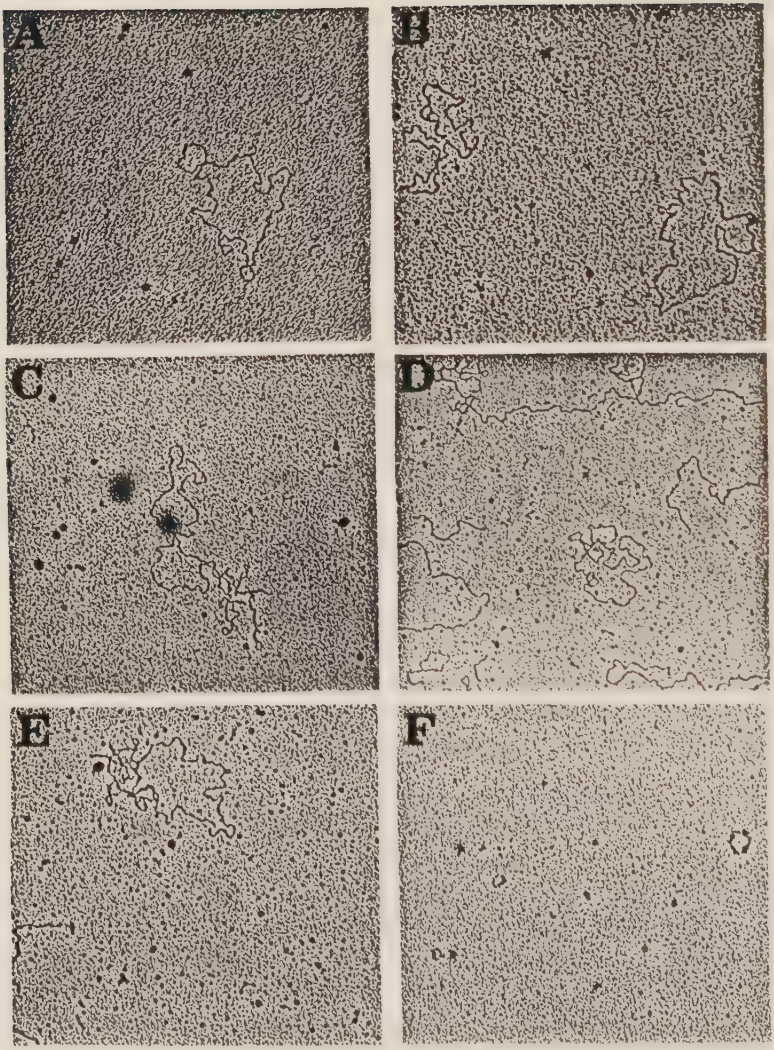


Abbildung 7: Trennung der DNS-Moleküle aus dem Ganzzellysat nicht infizierter BSC-1-Zellen in einem isopyknischen CsCl-EB-Dichtegradienten

Proteinausfällung erhaltene DNS-haltige Überstand wurde für einen Gradienten der mittleren Dichte von 1,58 g CsCl/ml bei einem Volumen von 6 ml und 300 µg EB/ml eingestellt. Die Zentrifugation erfolgte im 50 Ti - Rotor (Beckman) bei 40000 Upm, 20° C während 48 Stunden. Danach wurde der Gradient von unten in 100 µl-Fraktionen abgelassen. Die Radioaktivität wurde von 20 µl-Aliquots im Scintillationszähler gemessen. Der CsCl-Dichteverlauf wurde mit Hilfe des Refraktionsindexes bei jeder fünften Fraktion ermittelt.

Die grafische Darstellung (Abbildung 7) zeigt eine Bildung mehrer Banden. Die Fraktionen 27-43 enthalten lineare bzw. offene zirkuläre DNS. Die Banden bei höheren Dichten stellen also ringförmige DNS dar. Da es jedoch unklar ist, welche Bande mitochondriale bzw. minizirkuläre cytoplasmatische DNS enthält, waren weitere Untersuchungen erforderlich. In diesem Fall wurde die Charakterisierung mittels Elektronenmikroskopie gewählt. Dazu wurden die Reste der Fraktionen 1-3, 5-7, 9-11, 16-18, 20-21, 22-25 mit den Dichten von 1,652-1,649, 1,643-1,637, 1,631-1,625, 1,61-1,604, 1,599-1,595, 1,592--1,583 g CsCl/ml gesammelt. Diese 6 Proben wurden zweimal über 24 Stunden gegen je 500faches Volumen Tris--Puffer dialysiert. Durch diese Dialyse sollten die Proben von dem, die Spreitungstechnik störenden CsCl befreit werden. Das nicht ausdialysierbare, in die DNS interkalierte Äthidiumbromid stört die weitere Präparation nicht.


A
B
C
D
E
F

Die Abbildung 7.1. zeigt Beispiele der, in den verschiedenen Fraktionen des CsCl-EB-Gradienten bandierenden DNS-Moleküle aus dem Ganzzellysat nicht infizierter Zellen.

Wie die Aufnahmen zeigen, wurden in fünf Fraktionen bei der höheren CsCl-Dichte mitochondriale DNS-Moleküle gefunden. Die Bande der Fraktionen 22-25 enthält minizirkuläre DNS.

Abbildung 7.1.: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der DNS-Moleküle aus dem in Abbildung 7 dargestellten CsCl-EB-Gradienten
A: Fraktion 1-3, B: Fraktion 5-7,
C: Fraktion 9-11, D: Fraktion 16-18,
E: Fraktion 20-21, F: Fraktion 22-25
Vergrösserung: 24000

3. 3. 2. Trennung und Charakterisierung der DNS aus Ganzzellysaten SV40-infizierter Zellen

Die Abbildung 8 zeigt eine Auftrennung der DNS-Moleküle aus einem Ganzzellysat SV40-infizierter Zellen in einem 9 ml CsCl-EB-Gradienten der mittleren Dichte von 1,6 g CsCl/ml mit 300 µg EB/ml. Hierfür wurden $3,6 \times 10^7$ Zellen 96 Stunden nach der Infektion direkt in Petrischalen mit 1%iger SDS-Lösung lysiert. Der auf den oben beschriebenen CsCl-EB-Gradienten eingestellte DNS-haltige Überstand aus der Proteinausfällung wurde mit 40000 Upm 48 Stunden bei 20° C zentrifugiert. Im gleichen Rotor wurden parallel zu dem in Abbildung 8 dargestellten Gradienten die restlichen zwei Drittel des DNS-haltigen Überstandes unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden alle drei Gradienten von unten in 100 µl-Fraktionen abgelassen. Die Radioaktivität wurde jeweils von 20 µl-Aliquots gemessen und der Dichteverlauf der Gradienten wurde durch Ermittlung bei jeder zehnten Fraktion festgestellt.

Alle drei Gradienten zeigen das gleiche Trennungsmuster wie in Abbildung 8 dargestellt. Die Maxima der gemessener Radioaktivität wurden bei etwa den gleichen Dichten gefunden. Die Unterschiede der gemessenen Dichten bei gleichen Fraktionen sind nur geringfügig, so dass sie vernachlässigt werden können. Sie sind wahrscheinlich auf Ablesefehler im Refraktometer, Temperaturschwankungen bei der Messung bzw. unterschiedliche Viskosität der Proben zurückzuführen.

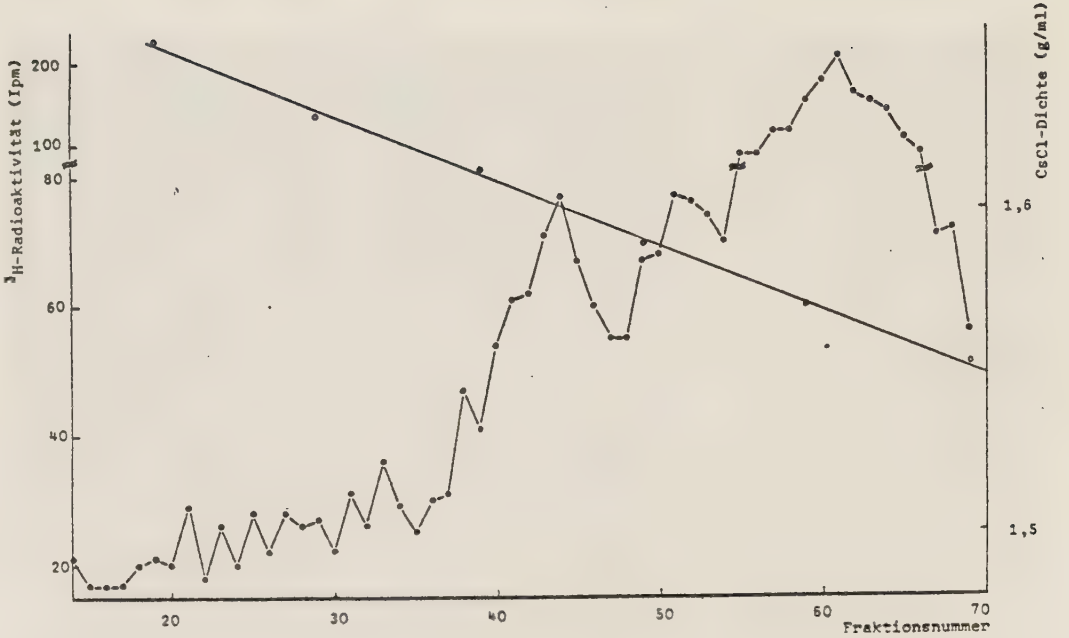


Abbildung 8: Trennung der DNS-Moleküle aus dem Ganzzellysat SV40-infizierter BSC-1-Zellen in einem isopyknischen CsCl-EB-Gradienten

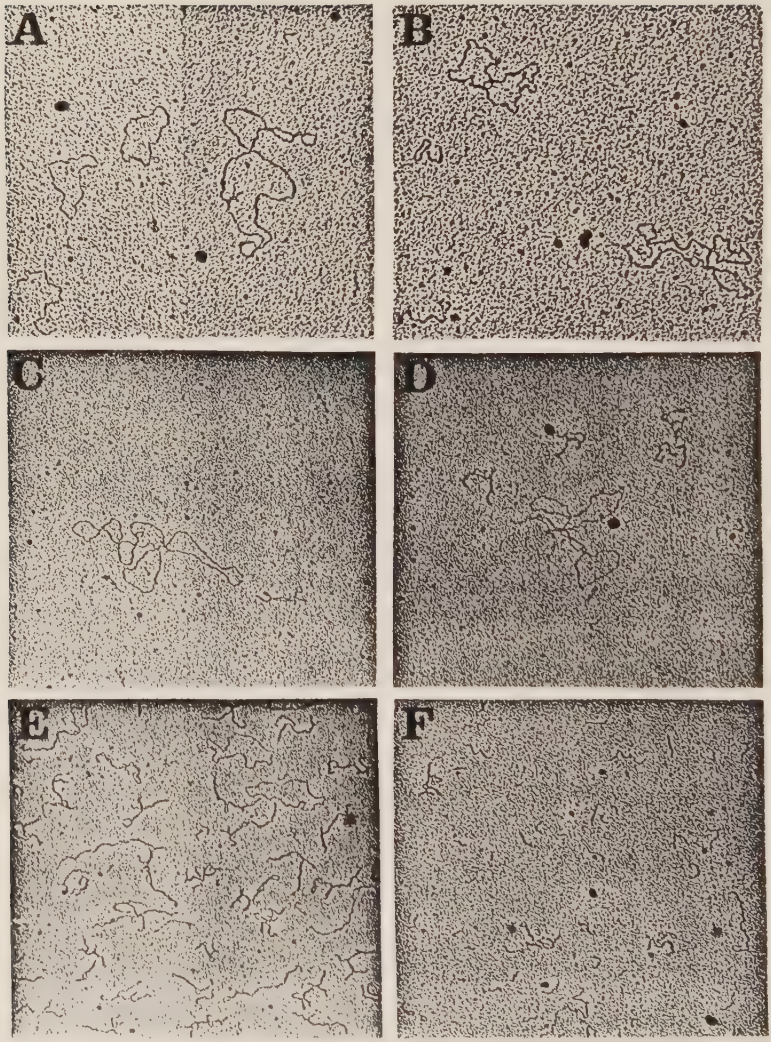

A
B
C
D
E
F

Abbildung 8.1.: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der DNS-Moleküle aus dem in Abbildung 8 dargestellten CsCl-EB-Gradienten
A: Fraktion 21-25, B: Fraktion 26-30,
C: Fraktion 31-35, D: Fraktion 37-40,
E: Fraktion 41-48, F: Fraktion 49-55
Vergrösserung: 24000

Die DNS bildet auch hier, wie in dem in Abbildung 7 gezeigten Gradienten, mehrere Banden in dem Schwebedichtebereich der zirkulären DNS. Die lineare DNS befindet sich in den Fraktionen 55-70. Da auch in diesem Fall die DNS--Art der jeweiligen Banden analysiert werden sollte, wurden folgende Fraktionen gesammelt: 21-25 (1,649-1,641 g CsCl/ml), 26-30 (1,639-1,631 g CsCl/ml), 31-35 (1,629--1,621 g CsCl/ml), 37-40 (1,617-1,613 g CsCl/ml), 41-48 (1,611-1,595 g CsCl/ml) und 49-55 (1,593-1,581 g CsCl/ml). Jede so erhaltene Probe wurde in zwei gleiche Teile geteilt. Ein Teil dieser Proben, für die elektronenmikroskopische Untersuchung bestimmt, wurde zweimal über 24 Stunden gegen je 500faches Volumen Tris-Puffer dialysiert.

Die Abbildung 8.1. zeigt Beispiele der in den verschiedenen Fraktionen des CsCl-EB-Gradienten bandierenden DNS-Moleküle aus dem Ganzzellysat SV40-infizierten Zellen (Abbildung 8).

In den ersten fünf Fraktionen konnten neben der mt-DNS auch SV40-DNS-Moleküle beobachtet werden. Die Fraktion 49-55 enthält hauptsächlich minizirkuläre DNS. Die hier gefundenen SV40-DNS-Moleküle bilden nur einen kleinen Anteil. Dagegen wurden in dieser Bande sehr viele DNS--Spaltprodukte gefunden.

Der zweite Teil der DNS-haltigen Proben wurde mit Isopropanol von Äthidiumbromid befreit (Lozzarelli, 1968), anschliessend zweimal über 24 Stunden gegen je 500faches Volumen S-Puffer dialysiert und auf 5 ml 5-20% Saccharose--Gradienten aufgetragen. Diese Gradienten wurden in 41 SW - Rotor (Beckman) bei 36000 Upm 105 min bei 20° C zentrifugiert. Bei jedem Lauf wurde als externer Standart ^{14}C-Thymidin markierte SV40-DNS mit 20S für zirkuläre und 16S für offene zirkuläre Moleküle aus gereingtem Virus unter gleichen Bedingungen im gleichen Rotor mitzentrifugiert.
Die Analyse im linearen Saccharose-Gradienten ermöglicht die Aufschlüsselung des Anteils der DNS-Moleküle, die bei unterschiedlichen Schwebedichten im CsCl-EB-Gradienten (Abbildung 8) sedimentieren.

Die in Abbildung 9 dargestellte Verteilung der DNS-Moleküle nach ihren Sedimentationskonstanten wurde hier prozentual ausgewertet. Die Saccharose-Gradienten wurden von unten in gleich grosse Fraktionen direkt auf Filterpapierrondellen ausgetropft. Nach deren Trocknung wurde die Radioaktivität gemessen. Die gesamte Radioaktivität jedes Gradienten wurde gleich 100% gesetzt.

Durch die Verteilung der DNS in linearen Saccharose--Gradienten (Abbildung 9) kann der prozentuale Anteil der SV40-DNS mit 20-21S für zirkuläre Moleküle und 16S für lineare Moleküle, jeder Bande des in Abbildung 8 dargestellten CsCl-EB-Gradienten eindeutig festgestellt werden. Der grösste Anteil dieser Moleküle ist somit in

den Fraktionen 37-40 und 41-48 gefunden worden. Eine genaue Aussage über den Anteil aller SV40-DNS-Moleküle ist jedoch damit nicht möglich, da SV40-DNS Oligomere mit 24-45S (Martin et al., 1976)bildet, die dann mit ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit im Bereich der mitochondrialen DNS (34-39S für geschlossene DNS-Ringe, 24-27S für offene DNS-Ringe bzw. lineare DNS-Moleküle) in linearen Saccharose-Gradienten bandieren. Wie aus der Abbildung 9 ersichtlich, wird in allen Fraktionen ein grosser Anteil von langsam sedimentierenden DNS-Molekülen gebildet. Dies bedeutet aber nicht, dass diese Banden ausschliesslich cytoplasmatische, minizirkuläre DNS mit 4-18S (Solage und Laskov, 1975) beinhalten. Vielmehr wird hier deutlich, dass die Degradation der DNS während der weiteren Präparation erheblich ansteigt. Es konnte hiermit gezeigt werden, dass auch die Trennung der verschiedenen DNS-Moleküle in linearen Saccharose-Gradienten unzureichend ist.

Abbildung 9: Trennung der DNS-Moleküle aus Fraktionen A: 21-25, B: 26-30, C: 31-35, D: 37-40, E: 41-48, F: 49-55 des CsCl-EB-Gradienten (Abbildung 8) im linearen 5-20%igen Saccharose-Gradienten. Der Pfeil kennzeichnet die Position der SV40-DNS mit 20S. Die Zentrifugationsrichtung war von rechts nach links.

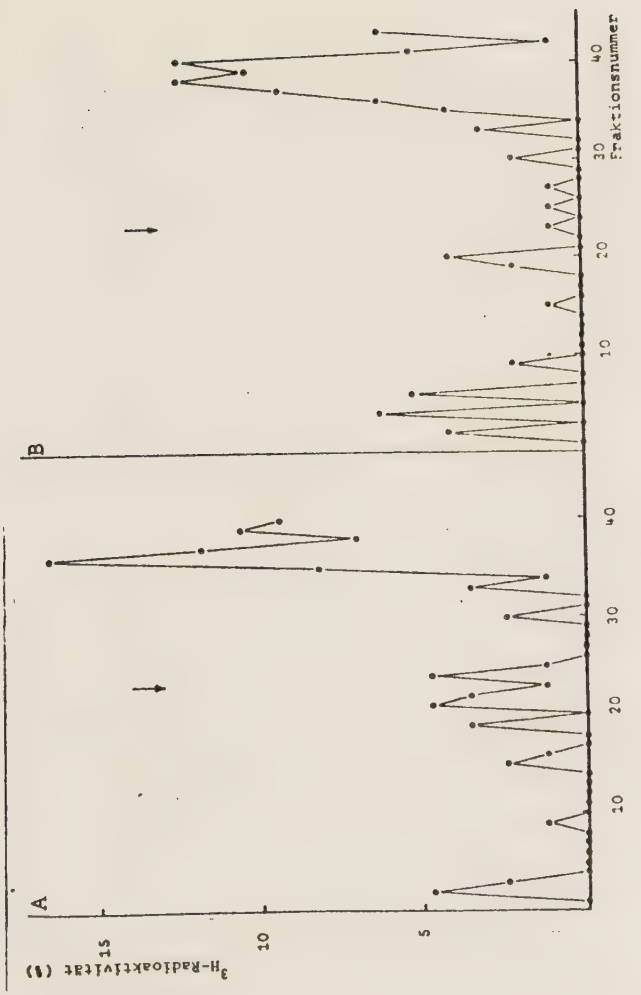

A
B
^{3}H-Radioaktivität (%)
15
10
5
10
20
30
40
10
20
30
40
Fraktionsnummer

Abbildung 9

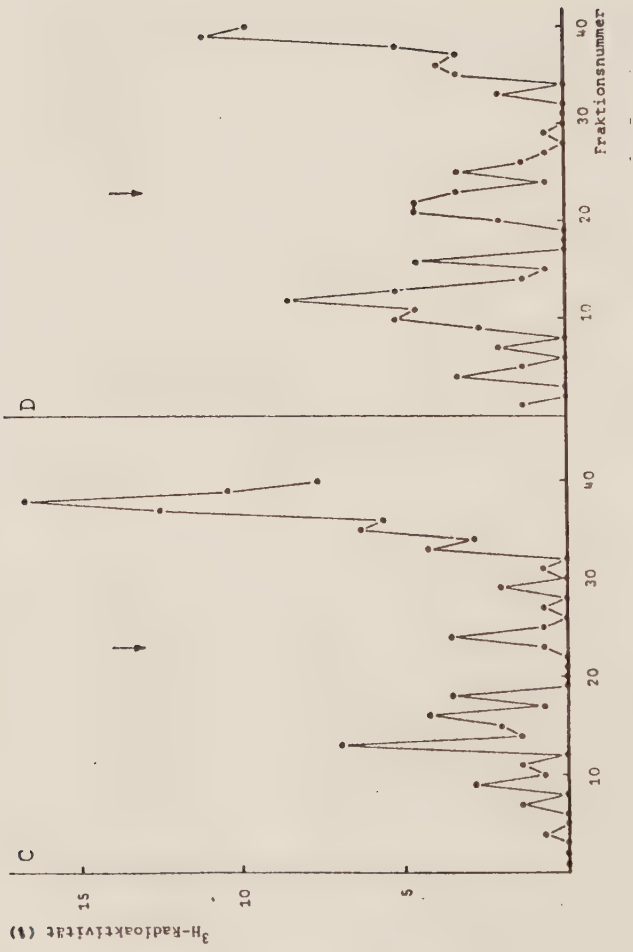


Abbildung 9

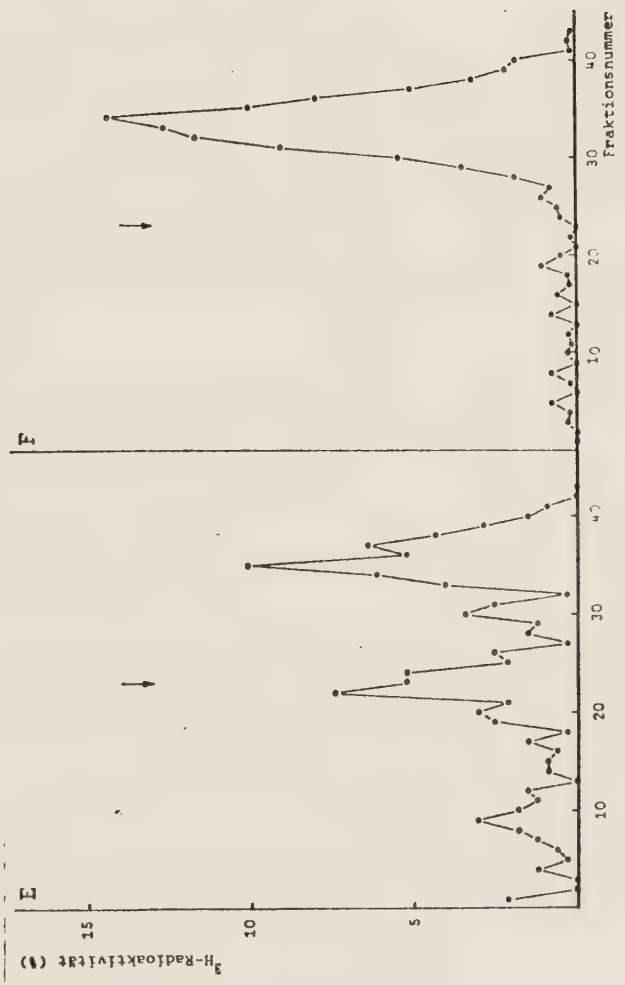


Abbildung 9

3. 3. 3. Analyse der DNS-Moleküle aus isolierten Mitochondrien infizierter und nicht infizierter Zellen

Wie in vorangegangenen Untersuchungen der DNS aus Ganzzellysaten gezeigt wurde, bildet die mitochondriale DNS im CsCl-EB-Gradienten im Bereich der geschlossenen zirkulären DNS mehrere Banden. Dieses Ergebnis spricht also für eine Heterogenität der Superhelixdichte der mitochondrialen DNS, sowohl der infizierten, als auch der nicht infizierten BSC-1-Zellen. Dadurch war es dringend angezeigt, diese DNS auch aus isolierten Organellen im CsCl-EB-Gradienten zu untersuchen.

Hierfür wurden Gradienten mit etwas höherer Ausgangsdichte des CsCl (1,6 g/ml) gewählt, um eine bessere Auftrennung im Bereich vor der linearen DNS-Bande zu erzielen.

In Abbildung 10 ist das Trennungsmuster der DNS-Moleküle aus isolierten Mitochondrien nicht infizierter Zellen im CsCl-EB-Gradienten (1,6 g CsCl/ml, 300 µg EB/ml) wiedergegeben. In diesem Gradienten mit dem Gesamtvolumen von 5 ml wurden 7,5 µg DNS (spezifische Radioaktivität: 160 Ipm/1 µg DNS) 48 Stunden bei 40000 Upm und 20° C im 50 Ti - Rotor zentrifugiert. Nach dem Lauf wurde der Gradient von unten in 100 µl-Fraktionen auf Filterpapierrondellen ausgetropft und die Radioaktivität der Proben anschliessend gemessen. Es wurden 69% der Radioaktivität wiedergefunden.

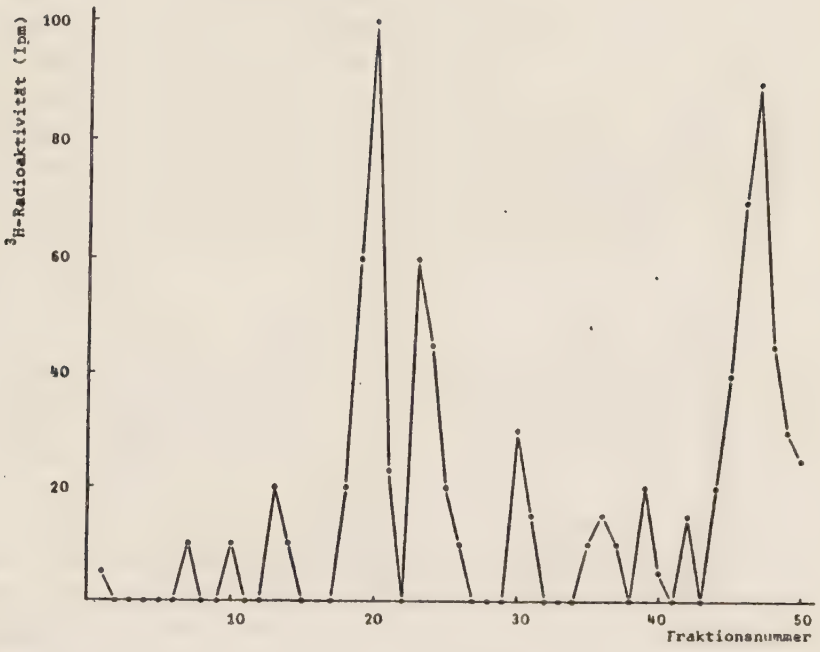


Abbildung 10: Trennung der DNS-Moleküle aus isolierten Mitochondrien nicht infizierter Zellen im CsCl-EB-Gradienten

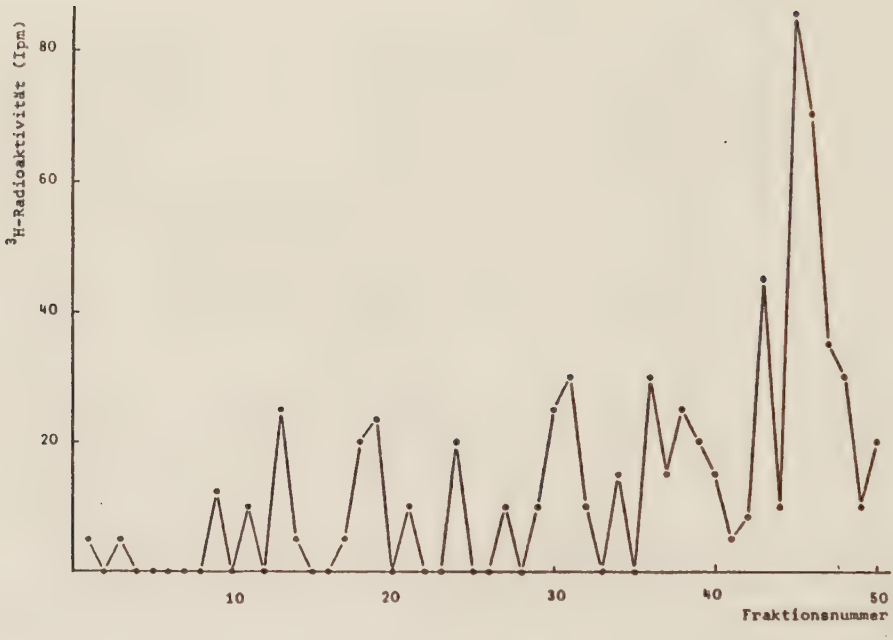


Abbildung 11: Trennung der DNS-Moleküle aus isolierten Mitochondrien SV40-infizierter Zellen im CsCl-EB-Gradienten

Die Abbildung 11 gibt das Trennungsmuster der DNS aus isolierten Mitochondrien infizierter Zellen im CsCl-EB-Gradienten (1,6 g CsCl/ml, 300 µg EB/ml) wieder. Hier wurden 35 ug DNS (spezifische Radioaktivität: 23 Ipm/1 ug DNS) im gesamten Gradientenvolumen von 5 ml 48 Stunden bei 40000 Upm und 20° C im 50 Ti - Rotor (Beckman) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient von unten in 100 µl-Fraktionen auf Filterpapierrondellen ausgetropft und die Radioaktivität dieser Proben gemessen. Es wurden 82% der Radioaktivität wiedergefunden.

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen eine Bildung mehrerer DNS-Banden im Bereich der zirkulärer DNS im CsCl-EB-Gradienten. Diese Tatsache deutet auf eine Heterogenität der Superhelixdichte bei mt-DNS-Molekülen hin.

Wie bereits unter 3.3. erwähnt, besteht eine Abhängigkeit der Schwebedichte der zirkulären DNS im EB-gesättigtem CsCl-Gradienten von der ursprünglichen Superhelixdichte dieser DNS (Bauer und Vinograd, 1968, 1970). Der Mechanismus der Interkalation des Farbstoffes in die DNS-Moleküle verdeutlicht diese Abhängigkeit. Hudson et al. (1969) zeigt, dass sich diese Interkalation in zwei Phasen vollzieht. Zunächst bindet zirkuläre DNS eine von der Superhelixdichte abhängige Menge des Farbstoffes und wird dadurch in eine offene, nicht verwundene Konformation überführt. Diese entspannten DNS-Moleküle binden weiter den Farbstoff bis zur Sättigung. Dadurch werden sie in der entgegengesetzten Richtung wieder verdrillt.

Die Anzahl dieser superhelikalen Windungen ist dann bei allen zirkulären DNS-Molekülen gleich. Eine hohe ursprüngliche Superhelixdichte resultiert dadurch in erhöhter Bindung des Farbstoffes bei dessen Sättigung und in abnehmender Schwebedichte im Dichtegradienten.

Diese theoretischen Grundlagen ermöglichten die genaue Bestimmung der Superhelixdichte bei SV40-DNS (Bauer und Vinograd, 1968) und anderen zirkulären DNS-Molekülen (Smith et al., 1971, Espejo und Canelo, 1968, Upholt et al., 1971).

Es war von grossem Interesse die Superhelixdichte der in Abbildungen 10 und 11 bandierenden DNS-Moleküle zu bestimmen und ihre möglicherweise, durch Virusinfektion verursachten Verschiebungen zu vergleichen. Die Bestimmung erfolgte nach der Arbeit von Eason und Vinograd (1971). Als Vergleichssubstanz diente ^{14}C-markierte SV40-DNS mit der Superhelixdichte σ_o = -0,039, die im gleichen Rotor unter den gleichen Bedingungen der in Abbildungen 10 und 11 dargestellten Gradienten mitzentrifugiert wurde. Das Trennungsmuster dieser DNS ist in Abbildung 12 grafisch dargestellt. Die zur Berechnung notwendige Daten (s. dazu 2.17.1.), sowie die resultierende Superhelixdichte sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Wie aus den Abbildungen 10 und 11 ersichtlich, bildet DNS aus isolierten Mitochondrien nicht infizierter Zellen 6 Banden im Bereich vor der linearen DNS im Gegensatz zur DNS aus Mitochondrien infizierter Zellen, die 8 Banden bildet.

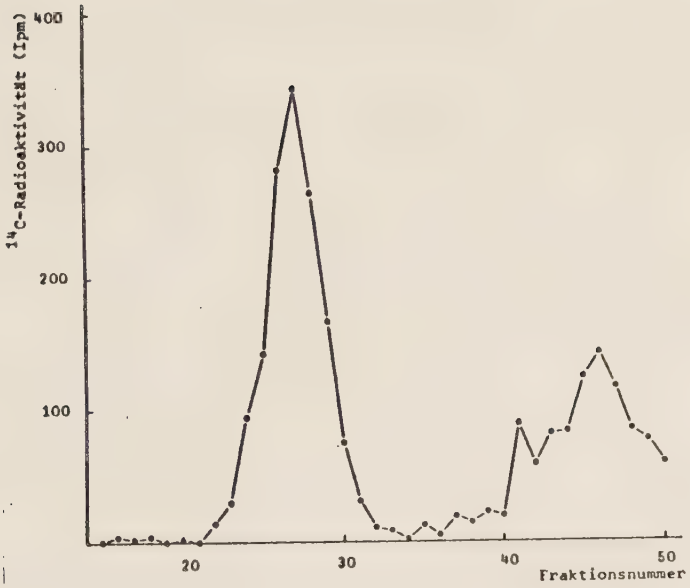


Abbildung 12: Trennung der DNS-Moleküle aus gereinigten SV40-Viruspartikeln im CsCl-EB-Gradienten

DNS aus:	Bande	Fraktion	$\bar{r}$	Δr	$\Delta\sigma$	σ_o	Anteil (%)
SV40	1	22-32	7,24	19		-0,039	
Mitochondrien nicht infizierter Zellen	A	13-14	7,67	33,7	0,088	0	6,3
	B	18-21	7,48	27,4	0,049	0	43
	C	23-26	7,32	23,1	0,023	-0,016	28,5
	D	30-31	7,13	16,7	-0,013	-0,052	9,5
	E	35-37	6,95	11	-0,044	-0,083	7,4
	F	39-40	6,84	7,8	-0,061	-0,1	5,3
Mitochondrien SV40--infizierter Zellen	I	13-14	7,67	33	0,084	0	9,4
	II	17-19	7,53	27,6	0,051	0	15
	III	21	7,43	25	0,035	-0,004	3,1
	IV	24	7,34	22	0,017	-0,022	6,3
	V	27	7,24	19	0,000	-0,039	3,1
	VI	29-32	7,13	15,5	-0,02	-0,059	23,6
	VII	34	7,00	12	-0,039	-0,078	4,7
	VIII	36-41	6,87	8	-0,06	-0,099	34,6

Tabelle 2: Zusammenfassung der für die Bestimmung der Superhelixdichte wichtigen Daten, die Superhelixdichte zirkulärer DNS-Moleküle aus Mitochondrien nicht infizierter und SV40-infizierter BSC-1-Zellen und deren prozentualer Anteil im Bereich der zirkulären DNS aus in Abbildungen 10 und 11 dargestellten CsCl-EB-Gradienten. $\bar{r}$: Abstand von Rotationsachse, Δr: Abstand zwischen linearen und zirkulären DNS-Molekülen im CsCl-EB-Gradienten, σ_o: Superhelixdichte, $\Delta\sigma$: σ_o- Superhelixdichte der SV40-DNS

Anhand der Superhelixdichte (Tabelle 2) und der elektromikroskopischen Nachprüfung der Banden aus Abbildung 7 bzw. 9, die hier zugezogen werden kann, da die Schwebedichtendifferenz zwischen linearen und zirkulären DNS-Molekülen in den CsCl-EB-Gradienten kaum Unterschiede aufweist, kann die DNS der jeweiligen Bande identifiziert werden. Die Banden A und B bzw. I und II enthalten mitochondriale DNS. Da ihre Superhelixdichte grösser als 0 ist, kann angenommen werden, dass es sich bei ihr um eine zirkuläre DNS ohne oder mit nur sehr geringer tertiärer Verdrillung handelt. Die Superhelixdichte der mitochondrialen DNS in Bande C ist niedriger als die der SV40-DNS, wobei die der ebenfalls mitochondrialen DNS in Bande D höher als diese ist. Diese zwei Banden fehlen im Trennungsmuster der DNS aus Mitochondrien infizierter Zellen. Hier tritt jedoch die Bande VI auf, deren Anteil sehr hoch ist. Diese Tatsache spricht dafür, dass die mitochondriale DNS in infizierten Zellen stärker verwunden ist, als die der nicht infizierten Zellen. Die Banden III, IV und V, die wiederum im Trennungsmuster der DNS aus Mitochobdrien nicht infizierter Zellen fehlen, konnten als SV40-DNS identifiziert werden. Die Superhelixdichte der DNS-Ringe in der Bande V entspricht genau der Superhelixdichte von SV40-DNS aus isolierten Viruspartikeln. Eason und Vinograd (1971) stellten fest, dass die intrazelluläre, noch nicht in Viruspartikel intergrierte SV40-DNS eine geringere Superhelixdichte besitzt. Diese Tatsache erklärt die niedrigere Superhelixdichte der DNS in Banden III und IV. Die Banden E und VII bzw. F und VIII stellen stark verwundene hauptsächlich minizirkuläre

DNS-Ringe dar. Der grosse Anteil der DNS aus infizierten Zellen in Bande VIII spricht für einen, zum grossen Teil, viralen Ursprung dieser DNS-Ringe.

Diese Ergebnisse zeigen eine Kontamination der mt-DNS aus isolierten Mitochondrien mit minizirkulären DNS-Molekülen und im Falle SV40-infizierter Zellen auch mit SV40-DNS. Die letztere ist mit grosser Wahrscheinlichkeit auf eine Teilzerstörung der Zellkerne im hypotonischen Puffer während der Präparation, und somit auf eine geringere Sedimentationsgeschwindigkeit dieser Kernteile im Stufensaccharosegradienten zurückzuführen.

3. 3. 4. Analyse der DNS-Moleküle aus cytoplasmatischen Überständen infizierter und nicht infizierter Zellen

Ausser der Superhelixdichte der mitochondrialen DNS war es auch von Interesse, die der minizirkulären, cytoplasmatischen DNS-Moleküle und deren Veränderung in infizierten Zellen kennenzulernen. Diese kleinen zirkulären Moleküle kontaminieren zu einem kleinen Teil die DNS-Präparation aus isolierten Mitochondrien, ihr grösster Anteil ist jedoch im Cytoplasma der Zellen zu finden.

In dem in Abbildung 13 dargestellten CsCl-EB-Gradienten (1,6 g CsCl/ml, 300 µg EB/ml) mit dem Gesamtvolumen von 9 ml wurde cytoplasmatischer Überstand aus $0,3 \times 10^8$ nicht infizierten Zellen nach der Proteinausfällung

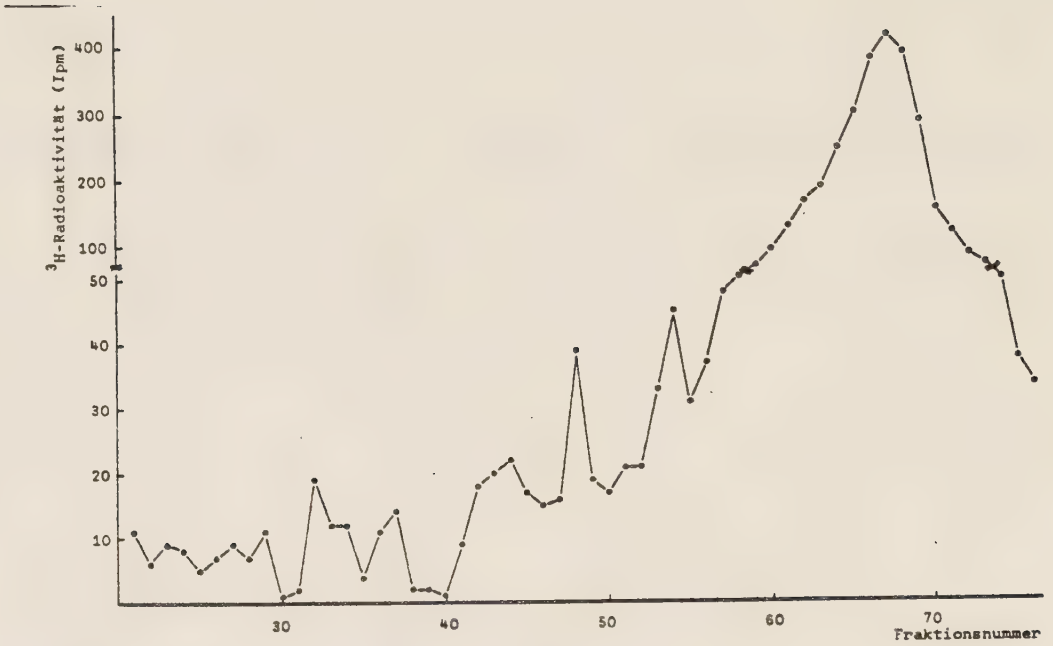


Abbildung 13: Trennung der DNS-Moleküle aus cytoplasmatischen Überständen nicht infizierter BSC-1-Zellen im CsCl-EB-Gradienten

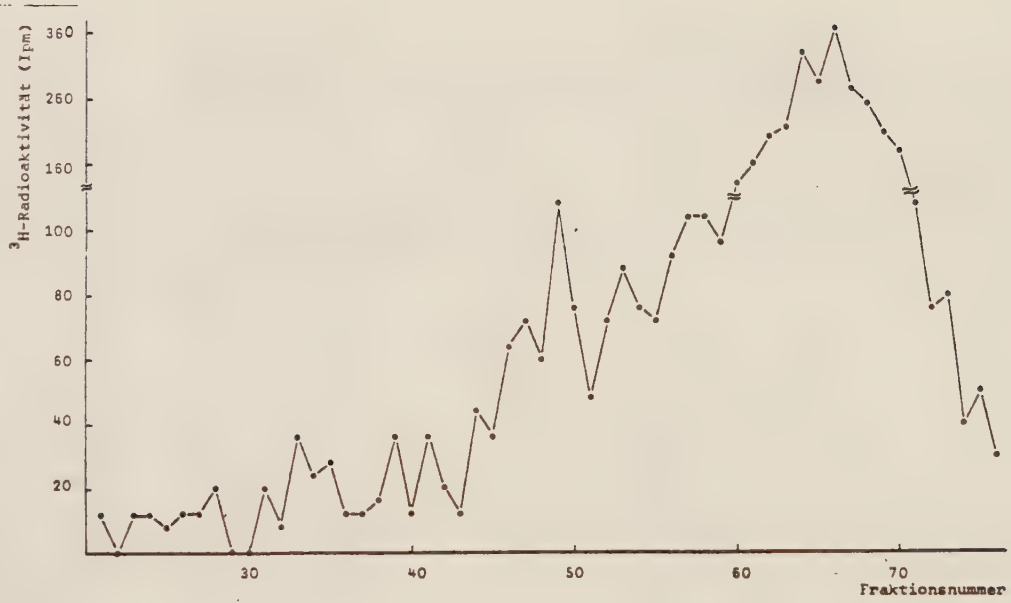


Abbildung 14: Trennung der DNS-Moleküle aus cytoplasmatischem Überständen SV40-infizierter BSC-1-Zellen im CsCl-EB-Gradienten

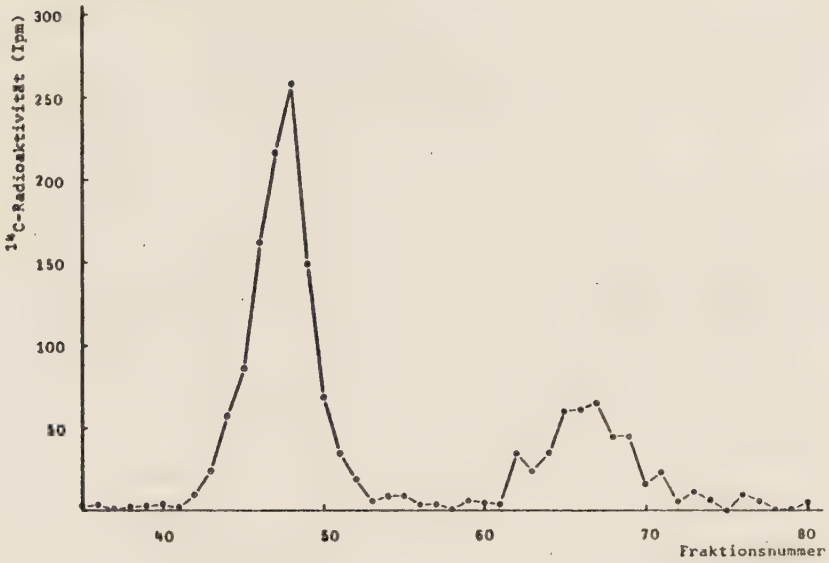


Abbildung 15: Trennung der DNS-Moleküle aus gereinigten SV40-Viruspartikeln im CsCl-EB-Gradienten

im 50 Ti - Rotor (Beckman) bei 40000 Upm 48 Stunden bei 20^{o} C zentrifugiert. In einem analogen Gradienten (Abbildung 14) wurde der cytoplasmatische Überstand aus 1 x 10^{8} SV40-infizierten Zellen im gleichen Rotor und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Die Abbildungen 13 und 14 zeigen auch hier eine Bildung mehrerer DNS-Banden im Bereich der zirkulären DNS. Auch hier wurden die Superhelixdichten der bandenbildenden DNS-Moleküle berechnet, um damit die Identifizierung der jeweiligen DNS zu ermöglichen. Hierfür wurde ebenfalls im gleichen Rotor, unter gleichen Bedingungen ^{14}C-markierte SV40-DNS mit σ_o = -0,039 als Vergleichssubstanz in einem 9 ml CsCl-EB-Gradienten (1,6 g CsCl/ml, 300 µg EB/ml) mitzentrifugiert. Das Trennungsmuster dieser DNS ist in Abbildung 15 abgebildet. Die zu dieser Berechnung notwendige Daten (s. dazu 2.17.1.), Superhelixdichte, sowie der prozentuale Anteil von der zirkulären DNS sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Die DNS-Moleküle der Banden A und B aus dem Cytoplasma nicht infizierter bzw. I aus dem Cytoplasma infizierter Zellen mit der Superhelixdichte höher als 0, wie sie auch in isolierten Mitochondrien gefunden wurden (3.3.3.), sind mitochondrialen Ursprungs. Die mitochondriale DNS mit einer niedrigen Superhelixdichte, wie sie in der Bande C gefunden werden kann, fehlt im Trennungsmuster der DNS aus dem Cytoplasma infizierter Zellen. Diese mt-DNS tritt im Cytoplasma infizierter Zellen mit einer höheren Superhelixdichte, als die der SV40-DNS in Bande V

DNS aus:	Bande	Fraktion	$\bar{r}$	Δr	$\Delta\sigma$	σ_o	Anteil(%)
SV40	1	42-52	6,45	19,5		-0,039	
cytoplasmatischen	A	32-34	6,94	32,2	0,083	0	10,2
Überständen nicht	B	36-37	6,82	28,3	0,053	0	5,9
infizierter Zellen	C	41-46	6,6	22,4	0,021	-0,018	25
	D	48-49	6,4	17,7	-0,01	-0,049	13,7
	E	51-55	6,24	12,7	-0,037	-0,076	35,8
cytoplasmatischen	I	31-35	6,94	31,7	0,075	0	11,4
Überständen SV40-	II	38-42	6,7	24,9	0,033	-0,006	11,8
infizierter Zellen	III	44	6,56	21	0,009	-0,03	4,3
	IV	46-47	6,47	18,5	-0,005	-0,044	13,4
	V	49-50	6,36	15,6	-0,021	-0,06	18,1
	VI	52-54	6,24	12	-0,04	-0,079	23,2

Tabelle 3: Zusammenfassung der für die Bestimmung der Superhelixdichte wichtigen Daten, Superhelixdichte zirkulärer DNS-Moleküle aus cytoplasmatischen Überständen nicht infizierter und SV40-infizierter BSC-1-Zellen und deren prozentualer Anteil im Bereich der zirkulären DNS aus in Abbildung 13 und 14 dargestellten CsCl-EB-Gradienten
$\bar{r}$: Abstand von Rotationsachse, Δr: Abstand zwischen linearen und zirkulären DNS-Molekülen im CsCl-EB-Gradienten, σ_o: Superhelixdichte, $\Delta\sigma$: σ_o- Superhelixdichte der SV40-DNS

auf. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der aus isolierten Mitochondrien erhaltenen Verschiebung (3.3.3.). Die Banden D und IV sind identisch und stellen auch mitochondriale DNS dar. Die DNS in Bande III, die im Trennungsmuster der DNS aus Cytoplasma nicht infizierter Zellen nicht gefunden werden kann, mit einer niedrigeren Superhelixdichte, als die der SV40-DNS aus gereinigten Viruspartikeln, kann der Virus-DNS zugeordnet werden (Eason und Vinograd, 1971). Die Banden E und VI werden von cytoplasmatischen, minizirkulären, stark tertiär verwundenen DNS-Molekülen gebildet. Trotz ihres hohen Anteils von zirkulären DNS-Molekülen in beiden Gradienten, ist die Kontamination der DNS aus Cytoplasma mit mitochondrialer und viraler DNS beträchtlich. Diese hohe Kontamination ist auf die Präparation im hypotonischen Puffer, in welchem auch die Zellkerne bzw. Mitochondrien zum Teil zerstört werden, zurückzuführen.

3. 4. Überführung der zirkulären mt-DNS-Moleküle in die lineare Form durch die Ribonuclease-Wirkung

Die Labilität mitochondrialer DNS in Alkali ist vereinbar mit der Intergration von Ribonucleotiden in dieser DNS. Da alle bisher untersuchten mt-DNS-Moleküle aus Säugertierzellen alkalisensitiv sind, ist anzunehmen, dass die Anwesenheit der Ribonucleotide in diesen DNS--Ringen eine allgemeine Eingenschaft der mt-DNS ist (Borst, 1972). Die Anwesenheit der Ribonucleotide in mt-DNS-Ringen konnte durch die Ribonuclease A, T_1 und H--Sensitivität dieser DNS-Moleküle aus Mitochondrien einiger weniger Säugertierzellen bestätigt werden (Grossman et al., 1973, Wong-Staal et al., 1973, Miyaki et al., 1973). Die Ribonucleasen greifen die in die mt-DNS eingebauten Ribonucleotide an und verursachen somit eine Überführung der zirkulären DNS-Moleküle in eine lineare oder zumindest eine offene Ringform. Da in SV40-DNS-Molekülen keine Ribonucleotide intergriert sind, wäre eine Möglichkeit der Trennung dieser von den DNS-Ringen mitochondrialen Ursprungs mit Hilfe der Ribonuclease gegeben. Damit könnte eine Kontamination der SV40-DNS mit mt-DNS aus Lysaten infizierter Zellen vermieden werden. Um die Effektivität der Spaltung der mt-DNS-Ringe mit Ribonucleasen nachzuprüfen, wurde zunächst DNS aus isolierten Mitochondrien nicht infizierter Zellen für die in Abbildung 16 dargestellten Versuche eingesetzt.

Hierfür wurden je 1 µg tritiierter mt-DNS (spezifische Radioaktivität: 172 Ipm/1 µg DNS) mit 0,4 mg RNase A (Abbildung 16 B) bzw. 300 U RNase T_1 (Abbildung 16 C), wie unter 2.19. bereits beschrieben, inkubiert und anschliessend in einem 5 ml CsCl-EB-Gradienten (1,58 g CsCl/ml, 300 µg EB/ml) im 50 Ti - Rotor (Beckman) bei 40000 Upm und 20° C 48 Stunden zentrifugiert.

Die Abbildung 16 A zeigt ein Trennungsmuster der Kontroll--mt-DNS (1 ug), die ohne RNase unter gleichen Bedingungen inkubiert und anschliessend in einem identischen CsCl-EB--Gradienten im gleichen Rotor mitzentrifugiert wurde. Alle Gradienten wurden von unten in 100 µl-Fraktionen abgelassen, deren Radioaktivität gemessen wurde.

Die gemessene Radioaktivität wurde prozentual ausgewertet, wobei die gesamte Radioaktivität eines Gradienten als 100% dargestellt ist.

Wie aus der Abbildung 16 A ersichtlich, werden nur 34% der unbehandelten mt-DNS aus isolierten Organellen als Ringe im CsCl-EB-Gradienten gefunden. Nach der Spaltung mit RNase A bzw. T_1 bleiben nur noch 13% bzw. 24% als Ringe erhalten. Mit Bezug auf die Kontrolle werden also 63% der mt-DNS-Ringe mit RNase A und 28% mit RNase T_1 in eine lineare Form überführt. Die in anderen Versuchen erhöhte Enzymmenge oder eine Inkubation der mt-DNS mit einem RNase A-T_1-Gemisch konnten eine totale oder höhere Spaltung der DNS-Ringe nicht verursachen. Diese Ergebnisse wurden durch die Arbeit von Wong-Staal et al. (1973) bestätigt.

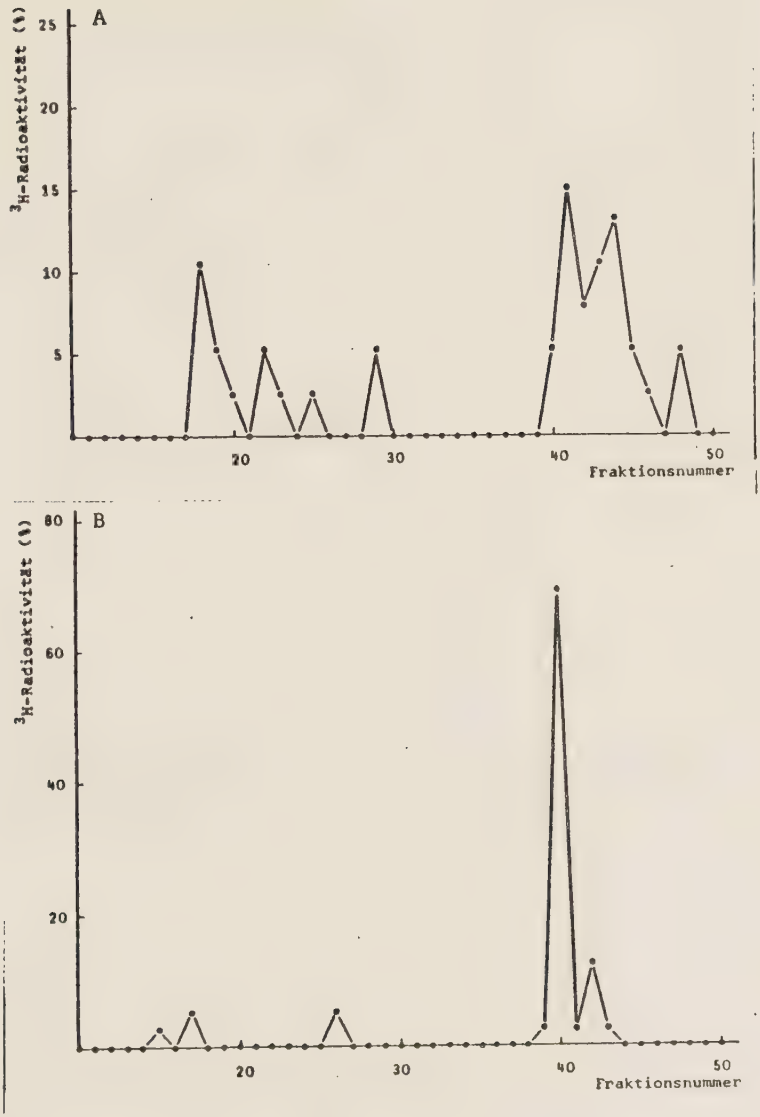


Abbildung 16

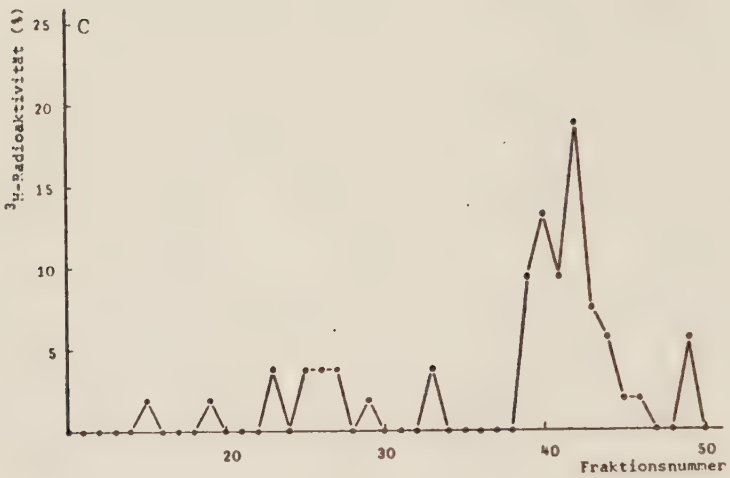


Abbildung 16: Trennung der mt-DNS im CsCl-EB-Gradienten nach Inkubation A: ohne Ribonuclease, B: mit Ribonuclease A, C: mit Ribonuclease T_1

Die Wirkung von Ribonuclease H aus Kalbsthymus (Büsen, 1976), die in weiteren Versuchen nachgeprüft wurde, konnte nicht als positiv bezeichnet werden.

Da eine vollständige Spaltung der mt-DNS-Ringe mit den hier untersuchten Ribonucleasen nicht erreicht werden konnte, erscheint diese Methode zur Trennung der mitochondrialen zirkulären DNS-Moleküle von SV40-DNS-Ringen nicht geeignet.

3. 5. Trennung der verschiedenen DNS-Moleküle mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese

Thorne (1966, 1967) zeigte als Erster, dass die Agar-Gel-Elektrophorese der unterschiedlichen molekularen Konfigurationen der Polyoma-Virus-DNS voneinander bzw. von den wirtseigenen DNS-Molekülen verwendet werden kann. Um diese Trennung zu verbessern, wurde später (Aaij und Borst, 1972) die Elektrophorese in Agarose und mit Äthidiumbromid durchgeführt. Auch hier wird die unterschiedliche Interkalationsfähigkeit des EB in lineare und zirkuläre DNS-Moleküle genützt. Wie bereits beschrieben (3.3.3.), werden die zirkulären DNS-Moleküle durch die, von der ursprünglichen Superhelixdichte abhängige Interkalation, in äusserst kompakte, dicht verwundene Strukturen überführt, die sich schneller durch die Agaroseporen bewegen können. Ein weiterer Vorteil des EB besteht in unmittelbarer Erkennungsmöglichkeit der DNS-Banden bei der Betrachtung bzw. Dokumentation des Gels unter UV-Lichtbestrahlung.

Die Abbildung 17 zeigt eine Trennung der mt-DNS-Moleküle aus isolierten Mitochondrien. A: nicht infizierte Zellen, B: infizierte Zellen. Als Marker diente SV40-DNS aus gereinigten Viruspartikeln (C). Die genauen Angaben zur Durchführung der Elektrophorese sind unter 2.20. beschrieben.

Abbildung 17: Agarose-gelelektrophoretische Trennung der DNS-Moleküle, A: aus isolierten Mitochondrien nicht infizierter Zellen, B: aus isolierten Mitochondrien SV40-infizierter Zellen, C: aus gereinigten SV40-Viruspartikeln

Wie aus der Abbildung 17 ersichtlich, bildet die mt-DNS sowohl aus nicht infizierten, wie auch infizierten Zellen nach der elektrophoretischen Auftrennung in Agarose-Gelen in Anwesenheit von EB drei Banden. Durch die Methode der Isolation der DNS aus Agarose-Gelen von Thuring (1975)

war die Möglichkeit der elektronenmikroskopischen Identifizierung dieser DNS-Molekülen gegeben. In der Bande 1 aus den Gelen A und B wurde lineare DNS, in der Bande 2 beider Gele offene DNS-Ringe mitochondrialer Grösse und in den Banden 3 und 4 stark verwundene mt-DNS gefunden. Die Ursache dafür, dass die superhelikale mt-DNS im Gel A nicht so weit gewandert ist, wie die aus dem Gel B, liegt an dem viel höheren Anteil der linearen DNS im Gel A. Die Banden 5 und 6 in den Gelen B und C stellen SV40-DNS dar, wobei in Bande 6, den Erwartungen entsprechend, zirkuläre DNS gefunden wurde.

In den in Abbildung 18 dargestellten Agarose-Gelen wurde DNS aus cytoplasmatischen Überständen, A: nicht infizierter, B: infizierter Zellen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Vergleichssubstanz wurde SV40-DNS aus gereinigten Viruspartikeln verwendet (C). In dem Gel B befindet sich mehr Material, um die kontaminierende SV40-DNS darstellen zu können.

Auch hier wurde die DNS aus den Banden extrahiert und elektronenmikroskopisch untersucht. In den Banden 3 der Gele A und B wurde minizirkuläre DNS gefunden. Die Banden 1 und 2 des Geles C beinhalten SV40-DNS. Die zirkuläre SV40-DNS der Bande 2 konnte im Gel B nicht gefunden werden.

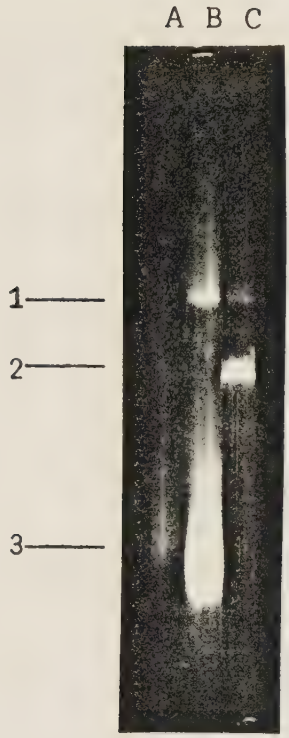


Abbildung 18: Agarose-gelelektrophoretische Trennung der DNS-Moleküle, A: aus cytoplasmatischem Überstand nicht infizierter Zellen, B: aus cytoplasmatischem Überstand infizierter Zellen, C: aus gereinigten SV40-Viruspartikeln

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Agarose-Gel-Elektrophorese zusammen mit der Möglichkeit der Extraktion der DNS-Moleküle eine zufriedenstellende Trennung aufgrund ihrer Konfiguration bzw. Grösse darstellt.

4. D I S K U S S I O N

Bisher ist nicht geklärt worden, welche biologische Funktion der extranucleäre genetische Apparat in einer animalen Zelle übernimmt und auf welche Weise dieses cytoplasmatische genetische Material bei einer viralen Infektion mit dem Virusgenom in Beziehung treten kann.

Da der Träger dieses genetischen Systems eine DNS darstellt, lag es nahe, zunächst die Charakteristika dieser DNS-Moleküle zu untersuchen. Die auf diesem Gebiet seit etwa 15 Jahren betriebene intensive Forschung erlaubte uns, die Struktur und Funktion der mitochondrialen DNS vieler Organismen kennenzulernen (Nass und Nass, 1963, Borst, 1977).

Weiterhin konnten als ein Nebenprodukt der Arbeit von Radloff et al. (1967) kleine, zirkuläre DNS-Moleküle aus dem Cytoplasma von HeLa-Zellen isoliert werden. Die folgenden Untersuchungen dieser minizirkulären DNS-Moleküle führten zwar zur Aufklärung ihrer Struktur, deren Ursprung bzw. Funktion blieben aber weitgehend unbekannt. Ihre Ähnlichkeit mit der chromosomalen DNS lässt vermuten, dass sie im Zellkern synthetisiert werden (Williamson et al., 1972, Koch, 1973, Modak et al., 1975), oder als ein Artefakt der Degradation der chromosomalen DNS während des Prozesses der zellulären Differenzierung entstehen (Solage und Laskov, 1975). Manche Autoren stellten sogar die Hypothese auf, dass diese cytoplasmatischen DNS-Moleküle eine informative Rolle in der Zelle

übernehmen (Bell, 1969) bzw. in den lymphoiden Zellen als Transfer eines antigenetischen Signals von der äusseren Membran zum Zellkern fungieren (Lerner et al., 1971). Diese Vermutung wurde allerdings bis jetzt nicht bestätigt.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, wird die mitochondriale DNS-Replikation durch die chromosomale Kodierung einer Mitochondrien-spezifischen DNS-Polymerase (Bolden et al., 1977, Tanaka und Koike, 1978) vom Zellkern kontrolliert. Da bei einer Infektion animaler Zellen mit einem DNS-Virus die Initiation der Replikation und die Replikation der viralen DNS selbst ausschliesslich im Zellkern stattfinden, drängt sich die Frage auf, ob dieser Umstand eine Struktur- bzw. Verhaltensänderung, und damit verbunden möglicherweise eine Alteration der genetischen Beschaffenheit, der extranucleären DNS-Moleküle bewirkt.

Die deutliche Induktion sowohl der nucleären, als auch extranucleären, zelleigenen DNS nach der Infektion von BSC-1-Zellen mit SV40-Virus ermöglichte die weiteren Untersuchungen in einem geeigneten Zellsystem.

Als ein spezifisches Merkmal wurde der GC-Gehalt der extranucleären DNS-Moleküle nicht infizierter Zellen mit dem der infizierten Zellen verglichen. Es stellte sich dabei heraus, dass mit Bezug auf die Basenzusammensetzung kein Unterschied zwischen den mitochondrialen DNS-Molekülen besteht. Im Gegensatz dazu ist der GC-Gehalt der

cytoplasmatischen, minizirkulären DNS aus infizierten Zellen etwas erhöht gegenüber dieser DNS aus nicht infizierten Zellen.

Dieser Befund könnte mit einer mehrfach beobachteten Integration viraler DNS-Sequenzen in die nucleäre, also wirtseigene, während der lytischen Infektion synthetisierte DNS (Frenkel, 1977, Hölzel und Sokol, 1974, Hirai und Defendi, 1972, Waldeck et al., 1973, Rigby und Berg, 1978) erklärt werden. Damit könnte aber ebenso auch die Hypothese unterstützt werden, dass es sich bei der cytoplasmatischen, minizirkulären DNS um Spaltprodukte der chromosomalen DNS handelt. Eine Klärung dieser Frage könnten Hybridisierungsversuche der cytoplasmatischen DNS-Moleküle mit der viralen DNS liefern.

Weiterhin wurde als ein typisches Charakteristikum der zirkulären, nicht chromosomalen DNS-Moleküle, die Superhelizität untersucht. Aufgrund der Interkalationsfähigkeit des Farbstoffes Äthidiumbromid in die DNS gelang es, die geschlossenen ringförmigen DNS-Moleküle wegen ihrer superhelikalen Windungen von den Ringmolekülen mit mindestens einem Einzelstrangbruch, und somit ohne tertiäre Windungen, und den linearen DNS-Molekülen in einem isopyknischen CsCl-EB-Dichtegradienten zu trennen (Radloff, 1967).

In der Regel wurden in allen Arbeiten, die diese Methode der Trennung benutzten, Gradienten von einem kleinem Volumen (ca. 3 ml) mit einer verhältnismässig grossen

Menge des zu trennenden Materials verwendet. Die Trennung resultiert dann in einer Bildung von zwei DNS-Banden im Gradienten, die die Bezeichnung Komponente I für geschlossene zirkuläre DNS, bzw. Komponente II für lineare und nicht geschlossene zirkuläre DNS erhielten. Wie jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind bei Volumenvergrösserung der Gradienten mehrere DNS-Banden im Bereich vor der Komponente II, also bei höherer Dichte, zu beobachten. Da die Position im Gradienten, wie bereits erwähnt, von der Menge des interkalierten Farbstoffes, und somit von der Superhelixdichte der jeweiligen DNS-Moleküle abhängig ist, ist eine Aussage über die Superhelixdichte der DNS-Moleküle der jeweiligen Bande möglich.

In Verbindung mit einer elektromikroskopischen Überprüfung konnte eine Heterogenität der Superhelixdichte bei mitochondrialen DNS-Molekülen festgestellt werden. Die Superhelixdichte der minizirkulären cytoplasmatischen DNS-Moleküle zeigte sich dagegen als weitgehend homogen und höher, als die der mitochondrialen DNS-Moleküle.

Darüberhinaus wurde gezeigt, dass die Superhelixdichten der DNS-Moleküle aus Mitochondrien infizierter Zellen in anderen prozentualen Anteilen auftreten, als die der nicht infizierten Zellen. Diese Tatsache unterstützt also in keiner Weise die Annahme, dass innerhalb von Zellen die zirkulären Nucleinsäuren in ein Medium eingebettet sind, in dem sie in entspannter Form ohne tertiäre Windungen vorliegen und demnach die Superheli-

zität nur einen Artefakt der Isolierung in einem Medium darstellt, dessen Ionenstärke oder pH-Wert nicht den natürlichen Bedingungen entsprechen. Weiterhin wurde in den Arbeiten von Wang et al. (1974) und Hsieh und Wang (1975) ein Einfluss der Superhelizität der zirkulären DNS auf die Wechselwirkung zwischen ihr und manchen Enzymen und Proteinen, sowie auch eine von der Superhelizität abhängige Affinität des f1 Histons zur DNS (Vogel und Singer, 1975) gefunden. Es ist also anzunehmen, dass entweder die tertiären Windungen in Hinblick auf spätere Funktionen zirkulärer DNS gebildet werden oder deren zufällige Bildung solche Funktionen induzieren können.

Die beobachtete Heterogenität der Superhelixdichte der mitochondrialen DNS könnte auf die Wirkung eines Entdrehungsenzyms zurückgeführt werden. Das auch als Entspannungsenzym bezeichnete Protein wurde bereits aus mehreren tierischen Zellen isoliert und charakterisiert (Champoux, 1976, Keller, 1975, Vosberg et al., 1975, Young und Champoux, 1978). Dieses Protein vermag die tertiären Windungen der DNS zu entfernen und somit deren Dichte bis $\sigma_o = 0$ zu verringern. Hierbei wird ein Bruch-Dreh-Schliess-Mechanismus vermutet. Ein Bruch--Zwischenprodukt wurde jedoch noch nicht demonstriert. Die Aktivität dieses Enzyms wird weder von bekannten Endonucleasen-Hemmern inhibiert, noch ist sie der Aktivität einer Polynucleotid-Ligase gleichzustellen (Vosberg et al., 1975). Das Protein konnte sowohl aus den Zellkernen, als auch in einer kleinen Menge aus

Mitochondrien und Cytoplasma isoliert werden (Vosberg et al., 1975). Mit grosser Wahrscheinlichkeit spielt diese Aktivität während der Replikation der geschlossenen zirkulären DNS-Moleküle eine Rolle. Der grössere Anteil der DNS-Moleküle mit niedriger Superhelixdichte aus Mitochondrien nicht infizierter Zellen unterstüzt diese Vermutung. Dagegen werden die meisten DNS-Moleküle aus Mitochondrien infizierter Zellen mit einer höheren Superhelixdichte gefunden, also mit wenig DNS während ihrer Replikation, was den Erwartungen nach 96-stündiger Infektion entspricht.

Die Homogenität und hohe Superhelixdichte der minizirkulären, cytoplasmatischen DNS-Moleküle würde daher die Annahme zulassen, dass sie nicht repliziert wird. Dies müsste jedoch noch nachgeprüft werden.

Wie im Ergebnisteil bereits beschrieben, wurden in den Fraktionen zirkulärer DNS mit niedriger Superhelixdichte neben der mt-DNS aus infizierten Zellen, auch DNS-Moleküle viraler Grösse gefunden. Young und Champoux (1978) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass auch die SV40-DNS der Aktivität des Entspannungsenzyms unterliegt. Da aber die Superhelixdichte der zirkulären SV40-DNS aus gereinigten Viruspartikeln homogen ist, handelt es sich also auch hier wahrscheinlich um replikative DNS-Formen.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die technischen Schwierigkeiten der optimalen Trennung der verschiedenen zirkulären DNS-Moleküle voneinander, und damit der gezielten

Isolierung bestimmter nativer DNS-Moleküle. Deshalb wurde weiterhin die Trennungsmöglichkeit nach der Grösse und tertiären Struktur der zirkulären DNS im linearen Saccharose-Gradienten untersucht.

Hier ist allerdings nur die Position der monomeren SV40-DNS eindeutig feststellbar. Da die SV40-DNS während der lytischen Infektion auch superhelikale Oligomere (Goff und Berg, 1977, Martin et al., 1976, Israel et al., 1978) bildet, deren Sedimentationsgeschwindigkeit naturgemäss erhöht ist, entsteht in der Sedimentationsposition der superhelikalen mt-DNS ein Gemisch dieser DNS-Moleküle. Der schon oben beschriebene Verlust der tertiären Windungen verursacht zudem keine Bildung einer Bande. Im Bereich der langsam sedimentierenden minizirkulären DNS-Moleküle ist die Kontamination durch, während der Präparation entstandene Spaltprodukte der DNS, deutlich. Die minizirkuläre DNS kann dann mit Hilfe anschliessender isopyknischer Zentrifugation im CsCl-EB-Gradienten wieder gereinigt werden.

Die Trennung der SV40-DNS von der mt-DNS mit Hilfe der Ribonucleasen A, T_1 und H zeigte sich ebenfalls als unzureichende Methode. Die Ergebnisse aus Versuchen, bei denen die RNase A bzw. T_1 nicht alle mt-DNS-Moleküle in die Komponente II zuüberführen vermochte, auch nicht durch Steigerung der Enzymmenge und Verlängerung der Ikubationszeit, lassen vermuten, dass nicht in alle mt-DNS-Moleküle die bei vielen Zellarten gefundenen und postulierten wenigen Ribonucleotidsequenzen integriert

sind. Auch die Kombination dieser beiden Enzyme bewirkt keine erhöhte Spaltung der geschlossenen zirkulären mt-DNS. Diese Tatsache deutet daraufhin, dass Moleküle mit Guanosin auch Pyrimidin Ribonucleotide besitzen. Da aber die totale Alkalisensitivität (Wang et al., 1973) der mt-DNS auf die Anwesenheit der Ribonucleotide zurückzuführen ist, ist es angebracht, die Möglichkeit einer strukturbedingten Barriere durch die benachbarten Desoxyribonucleotide, die die RNase-Wirkung verhindert, nicht auszuschliessen. Warum die RNase H keine volle Aktivität zeigte, konnte wegen der beschrängten Menge des zur Verfügung gestellten Enzyms nicht mehr geklärt werden. Von Leis et al. (1973) wurde aber berichtet, dass RNase H die Phosphordiestherbindungen, durch die die Ribonucleotide zur DNS kovalent gebunden sind, nicht spaltet. Offen bleibt weiterhin die Frage nach dem Ursprung der Ribonucleotide in der mitochondrialen DNS. Es wurde spekuliert, dass die Integration während der mt-DNS-Replikation durch eine falsche Verbindungsrate der mt-DNS-Polymerasen begünstigt wird. Zur Klärung dieses Mechanismus sind weitere Untersuchungen an replikativen Formen der mt-DNS notwendig.

Die verhältnismässig besten Trennungsergebnisse zwischen zirkulärer viraler und mitochondrialer DNS liefert die Agarose-Gel-Elektrophorese. Da hier allerdings nur mit kleinen DNS-Mengen gearbeitet werden kann, und während der Extraktion der DNS die Materialverluste zu gross sind, ist die Effektivität eher als niedrig zu bezeichnen. Sie könnte durch verbesserte Extraktionsmethoden,

z. B. Agarase-Einsatz, weiterhin erhöht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich die vielfältige Fächerung der methodischen Problematik einer wirklichen sauberen Trennung der verschiedenen zirkulären DNS-Arten aus animalen Zellen nach Infektion mit dem SV40-Virus. Die hauptsächlichen Schwierigkeiten bestehen in einer optimalen Isolierung bestimmter DNS--Moleküle, was wiederum zur Aufklärung ihrer Strukturbesonderheiten eine unbedingte Voraussetzung darstellt. Die Optimierung der Organellenisolierung wäre der erste Schritt zur Vermeidung der Kontamination der extranucleären DNS mit SV40-DNS, sowie der mt-DNS mit minizirkulärer, cytoplasmatischer DNS. Die genaue Sequenzanalyse des SV40-Genoms (Fiers et al., 1978, Reddy et al., 1978) stellt unter Umständen eine weitere Voraussetzung seiner Trennung von der mt-DNS im Gemisch dar. Durch gezielte Restriktionsenzym-Spaltung und damit Überführung in definierte Fragmente, die sich bei Dichtegradienten--Zentrifugation in unterschiedlich verhaltende Komponente II-Anteile überführen lassen, wäre eine Abtrennung erreichbar. Nur wenn diese Bedingungen erfüllt werden können, wird es möglich sein, aus der Charakterisierung extranucleärer DNS und deren replikativen Formen, auf die biologische Funktion dieses genetischen Apparates in der Zelle auch während einer Virusinfektion Schlüsse ziehen zu können.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Arbeit stellt einen Versuch dar, die extranucleären DNS-Moleküle in animalen Zellen zu trennen und zu charakterisieren.Die Charakteristika sollten mit denen der nichtchromosomalen DNS gleicher Zellen während einer Infektion mit dem DNS-Virus SV40 verglichen werden.

Die Untersuchungen wurden an DNS nicht infizierter und mit SV40-Virus infizierter BSC-1-Zellen vorgenommen.

Es konnte simultan zur Induktion der Replikation viraler DNS eine Induktion der zelleigenen, nichtchromosomalen DNS-Replikation während der Infektion nachgewiesen werden.

Die Bestimmung des GC-Gehalts in CsCl-Dichtegradienten ergab keine Unterschiede im Vergleich der mitochondrialen DNS aus infizierten und nicht infizierten Zellen. Hingegen ist der GC-Gehalt der minizirkulären, cytoplasmatischen DNS-Moleküle aus infizierten Zellen etwas erhöht gegenüber dem der gleichen DNS-Moleküle aus nicht infizierten Zellen. In beiden Fällen liegt der GC-Gehalt der mitochondrialen DNS höher als der der minizirkulären DNS.

Mit Hilfe der Analyse in CsCl-EB-Gradienten konnte eine Heterogenität der Superhelixdichte der mitochondrialen DNS sowohl aus nicht infizierten, als auch aus infizierten Zellen gezeigt werden. Diese Heterogenität war auch bei den SV40-DNS-Molekülen zu beobachten. Die Superhelix-

dichte aller minizirkulärer, cytoplasmatischer DNS-Moleküle zeigte sich im Gegenteil dazu als weitgehend homogen und höher, als die der mitochondrialen und viralen DNS.

Die erhoffte vollständige Trennung der mitochondrialen von der viralen DNS durch deren Überführung in eine offenzirkuläre Form mit Hilfe von verschiedenen Ribonucleasen zeigte sich als nicht geeignet, da nicht alle mitochondrialen zirkulären DNS-Moleküle in die offene Form überführt werden konnten.

Die besten Trennungsergebnisse zwischen zirkulärer viraler und mitochondrialer DNS wurden durch die elektrophoretische Auftrennung der DNS-Gemische in Agarose-Gelen erzielt. Die Methodik der Extraktion der DNS aus Agarose-Gelen erlaubt jedoch wegen der grossen Verluste an Material nicht eine routinenmässige Anreicherung bestimmter DNS-Moleküle.

Die vielfältigen methodischen Schwierigkeiten einer wirklich sauberen Trennung der verschiedenen zirkulären DNS-Arten aus animalen Zellsystemen, besonders nach Infektion mit einem DNS-Virus werden diskutiert.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Aaij, C., Borst, P.: The gel electrophoresis of DNA. Biochim. Biophys. Acta 269, 192-200 (1972)

Anderer, F. A., Schlumberger, H. D., Koch, M. A., Frank, H., Eggers, H. J.: Structure of Simian Virus 40: II Symmetry and components of the virus particles. Virplogy 32, 511-523 (1967)

Bahr, G.F.: A unit mitochondrion: DNA content and response to X-irradiation. Advan. Cell Mol. Biol. 1, 267-292 (1971)

Barbanti-Brodano, G., Swetly, P., Koprowski, H.: Early evants in the infektion of permissive cells with Simian Virus 40: Adsorption, penetration and uncoating. J. Virol. 6, 78-86 (1970)

Bauer, W., Vinograd, J.: The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV-40 DNA in the presence of dye. J. Mol. Biol. 33, 141-171 (1968)

Bauer, W., Vinograd, J.: Interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. II. The free energy of superhelix formation in SV40 DNA. J. Mol. Biol. 47, 419-435 (1970)

Bauer, W., Vinograd, J.: The Interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. III. Dependence of the buoyant density upon superhelix density and base composition. J. Mol. Biol. 54, 281-298 (1970)

Bell, E.: I-DNA: Its packaging into I-somes and its relation to protein synthesis during differentiation. Nature 224, 326-328 (1969)

Blossey, H. CH., Künzel, H.: In vitro translation of mitochondrial DNA from Neurospora crassa. FEBS Lett. 24, 335-338 (1972)

Bolden, A., Noy, G. P., Weissbach, A.: DNA polymerase of mitochondria is a -polymerase. J. Biol. Chem. 252, 3351-3356 (1977)

Bond, H. E., Cooper, J. A., Courington, D. P., Wood, J. S.: Microsome-associated DNA. Science 165, 705-706 (1969)

Borst, P.: Mitochondrial nucleic acids. Ann. Rev. Biochem. 41, 334-376 (1972)

Borst, P.: Structure and function of mitochondrial DNA. TIBS 2, 31-34 (1977)

Büsen, W.: Zelluläre Ribonuclease H. Dissertation, Universität Tübingen, 1976

Champoux, J. J.: Evidence for an intermediate with a single-strand break in the reaction by the DNA untwisting enzyme. Proc. Nat.Acad. Sci. 73, 3488-3491 (1976)

Chou, J. Y., Martin, R. G.: Complementation analysis of Simian Virus 40 mutants. J. Virol. 15, 145-150 (1975)

Clayton, D. A., Vinograd, J.: Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human leukaemic leucocytes. Nature 216, 652-657 (1967)

Clowes, R. C.: Molecular structure of bacterial plasmids. Bact. Rev. 36, 361-405 (1972)

Cozzarelli, N. R., Kelly, R. B., Kornberg, A.: A minute circular DNA from Escherichia coli 15. Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 992-998 (1968)

D'Alisa, R. M., Gershey, E. L.: Simian Virus 40 T antigen binds to host cell chromosomes. Nature 274, 164-166 (1978)

Dawid, I. B.: Mitochondrial protein synthesis. In: Mitochondria: Biogenesis and bioenergetics, ed. S. G. van den Bergh et al. Elsevier/North Holland, Amsterdam, 35-51 (1972)

Diacumakos, E. G., Gershey, E. L.: Uncoating and gene expression of Simian Virus 40 in CV-1 cell nuclei inoculated by microinjection. J. Virol. 24, 903-906 (1977)

Eason, R., Vinograd, J.: Superhelix density heterogeneity of intracellular Simian Virus 40 deoxyribonucleic acid. J. Virol. 7, 1-7 (1971)

Ellis, R. J., Hartley, M. R.: Nucleic acids of chloroplasts. In: Nucleic acids, ed. K. Burton, Medical and Technical Publ. Co., Lancaster and Butterworth, London, 323-349 (1974)

Espejo´, R., Canelo, E. S.: Properties of bacteriophage PM2: A lipid-containing bacterial virus. Virology 34, 738-747 (1968)

Faye, G., Kujawa, C., Fukuhara, H.: Physical and genetic organization of petite and grande yeast mitochondrial DNA. J. Mol. Biol. 88, 185-203 (1974)

Fiers, W., Conteras, R., Haegeman, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., van Heuverswyn, H., van Herreweghe, J., Volkaert, G., Ysebaert, M.: Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. Natur 273, 113-120 (1978)

Frenkel, G. D.: Loss of supercoiled viral DNA after infection of permissive cells by Simian Virus 40. J. Virol. 21, 423-426 (1977)

Goff, S. P., Berg, P.: Structure and formation of circular dimers of Simian Virus 40 DNA. J.Virol. 24, 295-302 (1977)

Gray, H. B., Upholt, W. B., Vinograd, J.: A buoyand method for the determination of the superhelix density of closed circular DNA. J. Mol. Biol. 62, 1-19 (1971)

Grossman, L. I., Watson, R., Vinograd, J.: The presence of ribonucleotides in mature closed-circular mitochondrial DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 3339-3343 (1973)

Guerineau, M., Slonimsky, P. P., Avner, P.: Yeast episome: oligomycin resistance associated with a small covalently closed non-mitochondrial circular DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 61, 462-469 (1974)

Hatanaka, M., Dulbecco, R.: Induction of DNA synthesis by SV40. Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 736-740 (1966)

Hirai, K., Defendi, V.: Integration of Simian Virus 40 deoxyribonucleic acid into the deoxyribonucleic acid of permissive monkey kidney cells. J. Virol. 9, 705-707 (1972)

Hirt, B.: Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. J. Mol. Biol. 26, 365-369 (1967)

Hölzel, F., Sokol, F.: Integration of progeny Simian Virus 40 DNA into the host cell genome. J. Mol. Biol. 84, 423-444 (1974)

Hsieh, T. S., Wang, J. C. : Thermodynamic properties of superhelical DNAs. Biochemistry 14, 527-535 (1975)

Hudson, B., Upholt, W. B., Devinny, J., Vinograd, J.: The use of ethidium bromide analogue in the dye- - buoyant density procedure for the isolation of closed circular DNA: The variation of the superhelix density of mitochondrial DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 62, 813-820 (1969)

Hummeler, K., Tomassini, N., Sokol, F.: Morphological aspects of the uptake of Simian Virus 40 by permissive cells. J. Virol. 6, 87-93 (1970)

Israel, M. A., Byrne, J. C., Martin, M. A.: Biological activity of oligomeric forms of SV40 DNA. Virology 87, 239-246 (1978)

Keller, W.: Characterization of purified DNA-relaxing enzyme from human tissue culture cells. Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 2550-2554 (1975)

Klietmann, W., Seemayer, N.: Differences in the manifestation of virus-specific surface antigen between cells transformed by SV40 and UV-irradiated SV40[1]. Int. J. Cancer 7, 50-58 (1971)

Koch, J.: Cytoplasmic DNA's consisting of unique nuclear sequences in hamster cells. A possible role in cell differentiation and oncogenesis. FEBS Letters 32, 22-26 (1973)

Koch, M. A., Eggers, H. J., Anderer, F. A., Schlumberger, H.D., Frank, H.: Structure of Simian Virus 40 I. Purification and physical characterization of the virus particle. Virology 32, 503-510 (1967)

Leis, J. P., Berkower, I., Hurwitz, J.: Mechanism of action of ribonuclease H isolated from Avian Myeloblastosis Virus and Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 466-470 (1973)

Lerner, R. A., Meinke, W., Goldstein, D. A.: Membran- - associated DNA in the cytoplasm of diploid human lymphocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1212-1216 (1971)

Levine, A. J.: Induction of mitochondrial DNA synthesis in monkey cells infected by Simian Virus 40 and (or) treated with calf serum. Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 717-720 (1971)

Mahler, H. R., Cordes,E. H.: Biological chemistry, Harper & Row, New York (1969)

Martin, M. A., Howley, P. M., Byrne, J. C., Garon, C. F.: Characterization of supercoiled oligomeric SV40 DNA molecules in productively infected cells. Virology 71, 28-40 (1976)

Miyaki, M., Koide, K., Ono, T.: RNase and alkali sensitivity of closed circular mitochondrial DNA of rat Ascites Hepatoma cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 50, 252-258 (1973)

Modak, S. P., Commelin, D. L., Grosset, M. T., Imaizumi, T., Monnat, M., Scherrer, K.: DNA synthesis in circulating erythroblasts of anemic duck. Isolation and properties of nuclear and cytoplasmic-nonmitochondrial DNA. Eur. J. Biochem. 60, 407-421 (1975)

Nass, M. M. K.: Mitochondrial DNA: Advances, problems, and goals. Science 165, 25-35 (1969)

Nass, M. M. K., Nass, S.: Intramitochondrial fibres with DNA characteristics. J. Cell Biol. 19, 593-611 (1963)

Pope, J. H., Rowe, W. P.: Detection of specific antigens in SV40 transformed cells by immunfluorescence. J. Exp. Med. 120, 121-128 (1964)

Radloff, R., Bauer, W., Vinograd, J.: A dye-buoyant density method for the detection and isolation of closed- - circular duplex DNA: The closed circular DNA in HeLa cells. Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 1514-1521 (1967)

Rapp, F., Butel, J. S., Feldman, L. A., Kitahara, T., Melnick, J. L.: Differential effects of inhibitors on the steps leading to the formation of SV40 tumor and virus antigens. J. Exp. Med. 121, 935-944 (1965)

Reddy, V. B., Thimmappaya, B., Dhar, R., Subramanian, K. N., Zain, B. S., Pan, J., Ghosh, P. K., Celma, M. L., Weissman, S. M.: The genom of Simian Virus 40. Scince 200, 494-502 (1978)

Rigby, P. W. J., Berg, P.: Does Simian Virus 40 DNA integrate into cellular DNA during productive infection. J. Virol. 28, 475-489 (1978)

Ritzi, E., Levine, A. J.: Deoxyribonucleic acid replication in Simian Virus 40-infected cells. J. Virol. 5, 686-692 (1970)

Rush, M. G., Eason, R., Vinograd, J.: Identification and properties of complex form of SV40 DNA isolated from SV40-infected African Green Monkey (BSC-1) cells. Biochem. Biophys. Acta 228, 585-594 (1971)

Schildkraut, C. L., Marmur, J., Doty, P.: Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. J. Mol. Biol. 4, 430-443 (1962)

Simpson, L.: The kinetoplast of the hemophlagelates. Internat. Rev. Cytol. 32, 139-207 (1972)

Smith, H. S., Scher, C. D., Todaro, G.: Induction of cell division in medium lacking serum growth factor by SV40. Virology 44, 359-370 (1971)

Smith, C. A., Jordan, J. M., Vinograd, J.: In vivo effects of intercalating drugs on the superhelix density of mitochondrial DNA isolated from human and mouse cells in culture. J. Mol. Biol. 59, 255-272 (1971)

Smith, C. A., Vinograd, J.: Small polydisperse circular DNA of HeLa cells. J. Mol. Biol. 69, 163-178 (1972)

Solage, A., Laskov, R.: Characterization of cytoplasmic DNA of Mouse-Myeloma cells. Eur. J. Biochem. 60, 23-33 (1975)

Studier, F. W.: Sedimentation studies of the size and shape of DNA. J. Mol. Biol. 11, 373-390 (1965)

Tanaka, S., Koike, K.: DNA polymerase- is localized in mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Comm. 81, 791-797 (1978)

Tegtmeyer, P.: SV40 DNA synthesis: The viral replicon. J. Virol. 10, 591-598 (1972)

Thorne, H. V.: Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. Virology 29, 234-239 (1966)

Thorne, H. V.: Electrophoretic characterization and fractionation of polyoma virus DNA. J. Mol. Biol. 24, 203-211 (1967)

Thuring, R. W. J., Sanders, J. P. M., Borst, P.: A freeze--squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. Anal. Biochem. 66, 213-220 (1975)

Upholt, W. B., Gray, H. B. Jr., Vinograd, J.: Sedimentation velocity behavior of closed circular SV40 DNA as a function of superhelix density, ionic strength, connterion and temperature. J. Mol. Biol. 62, 21-38 (1971)

Vogel, T., Singer, M. F.: Interaction of f1 histone with superhelical DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 2597-2600 (1975)

Vosberg, H. P., Grossman, L. I., Vinograd, J.: Isolation and partial characterization of the relaxation protein from nuclei of cultured mouse and human cells. Eur. J. Biochem. 55, 79-93 (1975)

Waldeck, W., Kammer, K., Sauer, G.: Preferential integration of Simian Virus 40 deoxyribonucleic acid into a particular size class of CV-1 cell deoxyribonucleic acid. Virology 54, 452-464 (1973)

Wang, J. C., Barkley, M. D., Bourgeois, S.: Measurements of unwinding of lac operator by repressor. Nature 251, 247-249 (1974)

Werchau, H., Westphal, H., Maass, G., Haas, R.: Untersuchungen über den Nucleinsäurestoffwechsel von Affennierengewebe-Kulturzellen nach Infektion mit SV40. Archiv für die ges. Virusforschung 3, 351-360 (1966)

Westergaard, O., Marcker, K. A., Keiding, J.: Induction of a mitochondrial DNA polymerase in Tetrahymena. Nature 227, 708-710 (1970)

Westphal, H., Werchau, H., Maass, G., Haas, R.: Untersuchungen über den Nucleinsäurestoffwechsel von Affennieren-Kulturzellen nach Infektion mit SV40 Archiv für die ges. Virusforschung 3, 342-350 (1966)

Williamson, R. A., Mc Shane, T., Grunstein, M., Flavell, R. A.: Cytoplasmic DNA from primary embryonic cell cultures is not informational. FEBS Letters 20, 108-110 (1972)

Wolf, G., Tejmar, L., Borell, S., Klietmann, W.: SV40-transformed hamster cells resistant to 100-250 µl/ml of ethidium bromide. J. Cell Sci. 33, 157-169 (1978)

Wong-Staal, F., Mendelson, J., Goulian, M.: Ribonucleotides in closed circular mitochondrial DNA from HeLa cells. Biochem. Biophys, Res. Comm.53, 140-148 (1973)

Yoshike, K.: Studies on DNA from low-density particles of SV40. II. Noninfectious virions associated with a large.plaque variant. Virology 34, 402-409 (1968)

Young, L. S., Champoux, J.J.: Interaction of the DNA untwisting enzyme with the SV40 nucleoprotein complex. Nucleic Acids Res. 5, 623-635 (1978)

L E B E N S L A U F

Name:	Liana Tejmar
Geburtstag,-ort:	30. 4. 1950, Prag
Eltern:	Dr. phil. Margit Tejmar geb. Goceva und Dr. med. Jaroslav Tejmar
Schule:	
1956 - 1965:	Grundschule in Prag
1965 - 1968:	Mittlere allgemeinbildende Schule in Prag
1968 - 1969:	Käthe-Kollwitz-Gymnasium in Dortmund
1969 - 1970:	Staatliches Aufbaugymnasium in Laasphe
8. 7. 1970:	Reifeprüfung
Studium:	
WS 1970/71:	Studium der Chemie an der Universität Tübingen
ab SS 1971:	Studium der Biologie an der Universität Tübingen
27. 4. 1973:	Diplomvorprüfung in Zoologie, Botanik, Chemie, Physik
WS 1974/75:	Diplomprüfungen in Mikrobiologie (Hauptfach), Humangenetik und Anthropologie, Biochemie, Hygiene
SS 1975 - WS 1975/76:	Diplomarbeit "Wirkung von Äthidiumbromid auf die DNS-Synthese in isolierten Mitochondrien" am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesselschaft, Abt. Prof. Dr. F.A.Anderer in Tübingen

8. 1. 1976: Diplom des Fachbereiches Biologie der Universität Tübingen

seit 1. 2. 1976: Dissertation unter Anleitung von Priv. Doz. Dr. W. Klietmann am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, Abt. Prof. Dr.F.A.Anderer in Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren:

R.E.Bader, V.Braun, F. Gönnenwein, J.Guglielmi, W.F.Haberland, S.Kemmler-Sack, W.Löffler, G.F.Meyer, F.P.Möhres, E.Müller, H.Ritter, W. Rüdorff, E.Sander, J.Schmitt, B.Schwemmle, H.Suhr, G.Weitzel, K.Wöhrmann, H.Zähner